

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ana Čavka

**UTJECAJ DIJETE S VISOKIM UDJELOM SOLI NA MIKROVASKULARNU
REAKTIVNOST U POPULACIJI ZDRAVIH MLADIH ŽENA**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ana Čavka

**UTJECAJ DIJETE S VISOKIM UDJELOM SOLI NA MIKROVASKULARNU
REAKTIVNOST U POPULACIJI ZDRAVIH MLADIH ŽENA**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Mentorica: **prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med.**

Rad ima 96 stranice.

Velika hvala mojoj mentorici prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med. koja me uvela u prekrasnan svijet znanosti, koja mi je omogućila da radim ono što volim i koja me učila, poticala i pratila na svakom koraku nastanka ovoga doktorskog rada.

Hvala profesorima Bojanu Jelakoviću, Akosu Kolleru, Julianu H. Lombardu i Shaneu A. Phillipsu na svim korisnim savjetima i nesebičnoj potpori.

Hvala Aniti, Ivani i Lidiji, koje su mi bile desna ruka, pomoć i podrška.

Hvala svim članovima Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta Osijek.

I posebno hvala mojoj obitelji i dragim prijateljima, koji su uvijek tu uza me.

Sadržaj

1. UVOD.....	13
1.1. Utjecaj količine soli u svakodnevnoj prehrani na zdravlje čovjeka	13
1.2. Endotel, endotelna funkcija i endotelna disfunkcija	14
1.3. Metode koje se upotrebljavaju u procjeni vaskularne reaktivnosti i endotelne funkcije.....	19
1.3.1. Cirkulirajući endotelni biljezi	19
1.3.2. Cirkulirajuće endotelne stanice	20
1.3.3. Mjerenje vaskularne reaktivnosti i perifernog protoka krvi potaknutoga farmakološkim i endogenim agensima	21
1.4. Sol-osjetljivost i sol-rezistentnost	23
1.5. Studije na animalnim modelima.....	24
1.6. Utjecaj kratkotrajnih promjena količine soli u svakodnevnoj prehrani na vaskularnu funkciju – studije na humanom modelu	26
1.7. Izbor ispitanica - populacija zdravih mladih žena.....	29
1.8. Uloga vazokonstriktornih prostaglandina u nastanku i razvoju mikrovaskularne disfunkcije izazvane dijetom s visokim udjelom soli	29
1.9. Uloga reninsko angiotenzinskoga sustava u regulaciji mikrovaskularne funkcije tijekom kratkotrajnih promjena količine soli u svakodnevnoj prehrani.....	31
2. HIPOTEZA	34
3. CILJEVI	35
4. MATERIJALI I METODE.....	36
4.1. Populacija ispitanika	36
4.2. Protokol istraživanja.....	36
4.3. Određivanje protoka u mikrocirkulaciji kože	37
4.4. Definiranje učinka ciklooksigenaznih enzima (COX-1, -2) u promjeni mikrovaskularne reaktivnostinakon dijeta s visokim udjelom soli	39

4.5. Biokemijska mjerenja.....	39
4.6. Mjerenje plazmatske koncentracije tromboksana A ₂ - vazokonstriktornoga čimbenika ovisnoga o ciklooksigenazi.....	39
4.7. Mjerenje koncentracija serumskih topljivih adhezijskih molekula (sCAMs) ICAM-1, VCAM-1, E-selektina i endokana	40
4.8. Statistička analiza.....	40
5. REZULTATI.....	41
5.1. Karakteristike ispitanika.....	41
5.2. Biokemijski parametri.....	41
5.3. Utjecaj dijet s visokim i niskim udjelom soli na protok krvi u mikrocirkulaciji kože mjeren tehnikom laser Doppler	43
5.4. Mjerenje koncentracija topljivih adhezivnih staničnih molekula (sCAMs): ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina te koncentracije endokana u serumu nakon dijet s visokim i niskim udjelom soli	45
5.5. Utjecaj dijet s visokim i niskim udjelom soli na plazmatsku koncentraciju TXB ₂	46
5.6. Učinak indometacina, neselektivnoga inhibitora ciklooksigenaznih enzima (COX-1 i COX-2), i celekoksiba, selektivnoga COX-2 inhibitora, na protok krvi u mikrocirkulaciji kože	48
5.7. Učinak indometacina, neselektivnoga inhibitora ciklooksigenaznih enzima (COX-1 i COX-2), i celekoksiba, selektivnog COX-2 inhibitora, na plazmatsku koncentraciju TXB ₂ nakon dijet s visokim udjelom soli.....	50
5.8. Učinak administracije losartana tijekom sedmodnevnog LSD protokola na krvni protok mikrocirkulacije kože	52
5.9. Učinak administracije losartana tijekom sedamodnevnoga LSD protokola na plazmatsku koncentraciju TXB ₂	53
6. RASPRAVA	55
6.1. Uloga vazokonstriktornih prostaglandina u nastanku i razvoju mikrovaskularne disfunkcije izazvane dijetom s visokim udjelom soli	55
6.1.1. Dijetni protokol	56
6.1.2. Krvni tlak.....	56

6.1.3. Ispitivanje protoka u mikrocirkulaciji kože pomoću laser Doppler metode	57
6.1.4. Utjecaj dijeta s visokim udjelom soli na biljege endotelne funkcije	58
6.1.5. Učinak inhibicije ciklooksigenaza (COX-1, -2) na postokluzivni hiperemični protok krvi tijekom prehrane s visokim udjelom soli.....	60
6.2. Utjecaj blokade receptora AT1 na koncentraciju TXA2 u plazmi i na mikrocirkulaciju kože u populaciji zdravih mladih žena na dijeti s niskim udjelom soli	61
7. ZAKLJUČCI.....	67
8. SAŽETAK	68
9. SUMMARY	70
10. LITERATURA.....	72
11. ŽIVOTOPIS	94

Kratice

EDRF - endotelni čimbenici relaksacije (engl. endothelium-derived relaxing factors)

NO – dušikov oksid (engl. nitric oxide)

PGI₂ - prostaciklin

EDHF - endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (engl. endothelial-derived hyperpolarization factors)

eNOS - endotelna NO sintetaza

ADP – adenzin difosfat

COX-1 – enzim ciklooksigenaza-1

COX-2 – enzim ciklooksigenaza-2

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

EETs – epoksieikosatrienoične kiseline (engl. epoxyeicosatrienoic acids)

EDCF - endotelnih čimbenika kontrakcije (engl. endothelial-derived constricting factors)

ET-1 – endotelin

TXA₂ – tromboksan A₂

ED – endotelna disfunkcija

GMS – stanica glatkog mišića

ROS – slobodni radikali kisika

vWF - von Willebrandov čimbenik

CAMs - stanične adhezijske molekule (engl. cellular adhesion molecules)

ICAM-1 - međustanična adhezijska molekula 1 (engl. intercellular adhesion molecule 1)

VCAM-1 - krvožilna adhezijska molekula 1 (engl. vascular cellular adhesion molecule 1)

E-selektin - endotelno-leukocitna adhezijska molekula 2

Lp-PLA₂ - fosfolipaza A₂ povezana s lipoproteinom

ADMA - simetrični dimetilarginin

ESM-1 – endokan

CECs - cirkulirajuće endotelne stanice (engl. circulatory endothelial cells)

EPC - endotelne progenitorske stanice (engl. endothelial progenitor cells)

LDF – mjerenje protoka metodom laser Doppler (engl. Laser Doppler Flowmetry)

PU – jedinica protoka (engl. perfusion units)

PORH – postokluzivna reaktivna hiperemija

FMD - ultrazvučni test protokom posredovane dilatacije perifernih arterija (engl. Flow Mediated Dilation)

PWA - analiza pulsnoga vala (engl. pulse wave analysis)

PWV - određivanje brzine pulsnoga vala (engl. pulse wave velocity)

cIMT - debljine intima-media karotidne arterije (engl. carotid intima-media thickness)

ANG II – angiotenzin II

L-NMMA - L-N^G-monomethyl Arginine

DASH – studija Prehrambeni pristup zaustavljanju hipertenzije (engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension)

HS - visok udio soli (engl. high salt)

LS – nizak udio soli (engl. low salt)

HSD – dijeta s visokim udjelom soli (engl. high salt diet)

LSD – dijeta s niskim udjelom soli (engl. low salt diet)

RAS – sustav renin angiotenzin

ANG I - angiotenzin I

ACE - angiotenzin-konvertirajući enzim

AT1 – angiotenzinski receptor 1

AT2- angiotenzinski receptor 2

ITM – indeks tjelesne mase

WHR – omjer struk - bokovi (engl. waist-to-hip ratio)

AUC – površina ispod krivulje (engl. area under the curve)

PRA – plazmatska reninska aktivnost

TXB2 – tromboksan B2

SBP – sistolički arterijski tlak

DBP – dijastolički arterijski tlak

MAP – srednji arterijski tlak

R-O – indeks razlike protoka reperfuzije i okluzije

LFA-1- komplementarni ligand ICAM-1 na leukocitima (engl. [lymphocyte function-associated antigen 1](#))

Popis tablica

Tablica 1. Hemodinamički parametri ispitanika (32. stranica)

Tablica 2. Biokemijski parametri ispitanika (34. stranica)

Tablica 3. Solubilne stanične adhezijske molekule (sCAMs) i endokan (37. stranica)

Popis slika

Slika 1. Temeljno načelo vaskularne homeostaze (6. stranica)

Slika 2. Mjerenje protoka u mikrocirkulaciji kože metodom LDF (29. stranica)

Slika 3. Utjecaj sedmodnevne dijetе s visokim udjelom soli (HSD) na postokluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože (35. stranica)

Slika 4. Utjecaj sedmodnevne dijetе s niskim udjelom soli (LSD) na postokluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože (36. stranica)

Slika 5. Utjecaj sedmodnevne dijetе s visokim udjelom soli (HSD) na koncentraciju TXB2 u plazmi (38. stranica)

Slika 6. Utjecaj sedmodnevne dijetе s niskim udjelom soli (LSD) na koncentraciju TXB2 u plazmi (39. stranica)

Slika 7. Relativna promjena protoka u mikrocirkulaciji kože između vaskularne reperfuzije i okluzije (R-O) prije i poslije HSD protokola bez administracije indometacina i s njom (40. stranica)

Slika 8. Relativna promjena protoka u mikrocirkulaciji kože između vaskularne reperfuzije i okluzije (R-O) prije i poslije HSD protokola bez administracije celekoksiba i s njom (41. stranica)

Slika 9. Učinak indometacina na plazmatsku koncentraciju TXB2 poslije dijetе s visokim udjelom soli (HSD) (42. stranica)

Slika 10. Učinak celekoksiba na plazmatsku koncentraciju TXB2 poslije dijetе s visokim udjelom soli (HSD) (43. stranica)

Slika 11. Učinak administracije losartana tijekom sedmodnevnoga niskoslanoga dijetnog protokola na postokluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože (44. stranica)

Slika 12. Učinak sedmodnevnoga niskoslanoga dijetnog protokola uz administraciju losartana na plazmatske razine TXB2, vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazama (45. stranica)

Slika 13. Moguća uloga inhibicije AT1 receptora u regulaciji TXA2 razine i protoka krvi u mikrocirkulaciji mladih zdravih ispitanica na LS protokolu (57. stranica)

1. UVOD

1.1. Utjecaj količine soli u svakodnevnoj prehrani na zdravlje čovjeka

Tijekom nekoliko milijuna godina prethodnici današnjega čovjeka, kao i svi drugi sisavci, jeli su hranu koja je sadržavala male količine soli (manje od 0,5 g soli na dan) koja se prirodno nalazila u namirnicama. Količina soli u hrani počela se povećavati prije oko 5000 godina kada su Kinezi otkrili važnu ulogu soli u očuvanju namirnica. Sol je od tada postala roba od velike gospodarske važnosti i unos soli u prehrani dosegao je vrhunac negdje 1870-ih godina (1). Međutim, s izumom hladnjaka i zamrzivača, sol više nije bila potrebna kao konzervans i tako je započela kratka era opadanja količine soli koju su ljudi unosili u organizam svakodnevnom prehranom. Ipak, u zadnjih nekoliko desetljeća potrošnja i unos soli u organizam znatno su porasli zbog velikih količina NaCl u, danas sveprisutnoj, prerađenoj hrani (2). Kao rezultat toga prekomjeren unos soli u svakodnevnoj prehrani, koji je nadmašio dnevne potrebe ljudskoga organizma, postao je velik problem u gotovo svim dijelovima svijeta, pa tako i u Hrvatskoj. Danas ne govorimo o unosu soli koji bi bio prihvatljiv (do 5 grama), već o mnogo većim količinama (preko 10 grama, a ponegdje i još višim). Provedeno istraživanje pokazalo je da je prosječan dnevni unos soli u odrasloj populaciji Hrvatske $13,3 \pm 4,3$ g na dan ($223,6 \pm 74,0$ mmol Na/24h urin) za muškarce i $10,2 \pm 4,2$ g na dan ($177,3 \pm 69,1$ mmol Na/24h urin) za žene, upućujući na ozbiljan problem u prehrambenim navikama nacije (3). Evolucijski gledano, taj nagli porast količine soli u svakodnevnoj prehrani dogodio se relativno nedavno i kao takav predstavlja veliki izazov za fiziološki sustav čovjeka da takve velike količine soli uspije eliminirati iz organizma. Rezultati velikoga broja epidemioloških, evolucijskih i kliničkih studija doveli su do općeprihvaćene činjenice da je prekomjeren unos soli esencijalni čimbenik rizika za razvoj i progresiju hipertenzije (4-6), čime se povećava rizik od moždanoga udara, srčanoga udara, zatajenja srca i bolesti bubrega. Nadalje, dokazano je da povećan unos soli može imati izravan utjecaj na razvoj moždanoga udara (7,8), hipertrofije lijeve srčane klijetke (9), progresiju bubrežne bolesti i proteinuriju (10). Dakle, brojne su meta - analize potvrdile neospornu vezu između povišenoga unosa soli i posljednjih povišenih vrijednosti krvnoga tlaka – jednoga od glavnih čimbenika rizika za nastanak različitih kardiovaskularnih komplikacija i incidenata (11). Kao potvrda tim rezultatima, druge meta-analize pokazale su da reduciranje unosa soli za 1-3 g na dan značajno snižuje krvni tlak i smanjuje rizik od kardiovaskularnih incidenata i u populaciji s povišenim, a i u populaciji

s normalnim krvnim tlakom (12-15). Iako je najveći broj dosadašnjih velikih humanih studija usmjeren upravo na utjecaj količine soli u prehrani na krvni tlak i posljedične štetne učinke na kardiovaskularni i renalni sustav, novi pogled na tu temu donijela je studija Weinbergera i suradnika, koji su pokazali da štetni učinci soli na organizam mogu biti potpuno neovisni o promjeni krvnoga tlaka te da se manifestiraju i u normotenzivnih pojedinaca (16). Studije koje su slijedile potvrdile su nedvojben učinak promjene unosa soli u organizam na vaskularnu funkciju, a koji se zbiva neovisno o promjenama krvnoga tlaka. Od tada je učinjen velik broj studija u nastojanju da se razjasni način i mehanizmi kojima sol dovodi do promjena u vaskularnoj funkciji neovisnim o promjenama krvnoga tlaka, no oni još uvijek nisu u potpunosti jasni. Tako je i ovastudija tek jedan mali korak u nastojanju razjašnjavanja barem dijela mehanizama kojima sol u prehrani djeluje na promjene u vaskularnoj funkciji čak i u populaciji zdravih mladih ljudi.

1.2. Endotel, endotelna funkcija i endotelna disfunkcija

Nedavne studije pokazale su da je jedan od najranijih štetnih učinaka soli na ljudski organizam nastanak i razvoj endotelne disfunkcije koji se javlja i u pacijenata koji imaju esencijalnu hipertenziju, a i u normotenzivnih pojedinaca čak i nakon relativno kratkih razdoblja unosa velike količine soli u organizam (17-19).

Iako je nekad smatran jednostavnom preprekom između krvi i stijenke krvne žile, danas se zna da je endotel dinamičan organ koji oblaže čitav vaskularni sustav. Endotel je svojom strukturom jednostavan, ali raspodjelom gotovo sveprisutan organ, prosječne težine oko jednoga kilograma. Ukupni broj od 1 do 6×10^{13} endotelnih stanica, u sloju debljine 0.5 do 1 μm , prekriva unutarnje stijenke svih cirkulacijskih šupljina površine od 4000 do 7000 m^2 . Riječ je o heterogenoj epitelnoj strukturi visoke biološke dinamike i raznovrsnih metaboličkih aktivnosti s posebno naglašenim sposobnostima prilagodbe (20,21). Stanice endotela imaju niz važnih funkcija, koje uključuju prepoznavanje i prilagodbu na humoralne, mehaničke i hemodinamičke promjene. Najznačajnije su od njegovih funkcija su: kontrola vaskularnoga tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (22,23). Endotel djeluje kao moćna enzimatska prepreka, uspješno regulira tonus i proliferacijski status arterijske mišićnice, kontrolira izlučivanje citokina te stvaranje i ekspresiju adhezijskih molekula. U endotelnim se stanicama sintetiziraju

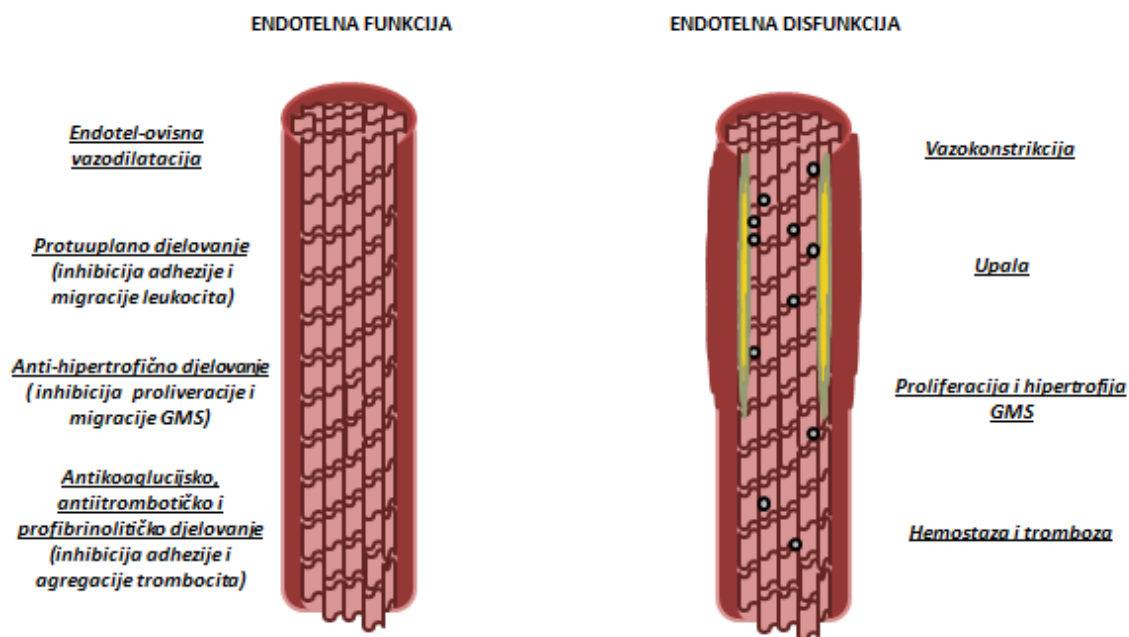
čimbenici rasta i agregacijsko-koagulacijskoga puta, nastaju receptori za lipoproteine i inzulin, održavaju aktivnosti lipoproteinske lipaze i angiotenzin-konvertaze, metaboliziraju noradrenalin i serotonin te stvaraju produkti arahidonske kiseline. Svojim autokrinim, parakrinim i endokrinim lučenjem one djeluju na niz staničnih linija – trombocite, leukocite i glatke mišićne stanice, ali i na druga, različito udaljena tkiva (20, 24-27).

Endotel krvnih žila ima kritičnu ulogu u održavanju vaskularnoga tonusa te su promjene vaskularnoga protoka u složenom međudjelovanju s endotelom. Sposobnost izazivanja vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka (žilni stres) jedno je od glavnih svojstava prikladne funkcije endotela. Krv u lumenu krvne žile djeluje na stijenku dvjema ortogonalnim silama. Tangencijalno usmjerena sila na jedinicu površine stijenke, primarno povezana s protokom, frikcijska je sila poznata kao sila smicanja (engl. *shear stress*). Druga je sila izravna sila istezanja koja na stijenku djeluje okomito i izravno, te odgovara krvnom tlaku. Na tangencijalnu deformaciju pod smicajnim utjecajem endotelne strukture reagiraju gotovo trenutačnim promjenama u staničnim membranama, reorganizacijom unutarnje strukture i programiranim usmjeravanjem niza biokemijskih procesa. Ta međusobno povezana zbivanja dio su jedinstvene i nespecifične reakcije kojom započinje niz akutnih i kroničnih adaptacijskih odgovora endotela na izravne podražaje. Endotelne stanice tako iskazuju sposobnost pretvaranja mehaničkih sila u biološke reakcije – rastezanje žilne stijenke bilježe mehanoreceptori koji onda potiču niz pojedinačnih događaja. Oni uključuju mehanizme poput dugotrajnih varijacija genske regulacije s pratećim restrukturiranjem žilne stijenke, ali i brze reakcije predstavljene naglom promjenom žilnog tonusa (22, 28-31). Važnost te funkcije endotela vidi se u činjenici da se izraz “endotelna funkcija” upotrebljava kako bi se opisala sposobnost endotela da otpušta vazoaktivne tvari i na taj način regulira krvni protok. U proteklih 30 godina otkriveni su brojni endotelni čimbenici relaksacije (engl. endothelium-derived relaxing factors, EDRF), kojih se većina otpušta u odgovoru na povećanu koncentraciju unutarstaničnoga kalcija. Najvažniji EDRF su dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI₂) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (engl. endothelial-derived hyperpolarization factors, EDHF). NO je prvi definirani EDRF za koji je dokazano da relaksira vaskularni glatki mišić (32-35). Sintetizira ga endotelna NO sintetaza (eNOS) iz L-arginina. NO se stvara i otpušta iz endotelnih stanica u odgovoru na žilni stres (engl. shear stress) i djelovanje različitih spojeva kao što su acetilkolin, bradikinin, trombin, ADP (adenozin difosfat) itd. Otpuštanje NO-a vodi do relaksacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica (23, 36-43). Osim vazodilatatornih svojstava,

NO sprječava adheziju i agregaciju trombocita, kao i adheziju i migraciju leukocita u arterijski zid te inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica – svih ključnih događaja u razvoju ateroskleroze (44-47). PGI₂ je drugi bitan EDRF koji se djelomično otpušta u odgovoru na žilni stres (36,48). Sintetizira ga enzim ciklooksigenaza-1 (COX-1) iz arahidonske kiseline, a djeluje tako da povišuje koncentraciju cikličnog adenozin monofosfata (cAMP-a) u glatkim mišićnim stanicama i u trombocitima (49). Za razliku od NO-a, PGI₂ ne pridonosi održavanju bazalnoga vaskularnog tonusa velikih provodnih krvnih žila, nego se otpušta na poticaj različitih agonista (44,50). Također ima važnu ulogu kao inhibitor djelovanja trombocita. EDHF su molekule koje dovode do hiperpolarizacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila. Njihova je uloga regulacija vaskularne reaktivnosti, koju definiramo kao o endotelu ovisan odgovor, u stanjima kada postoji kombinirana inhibicija djelovanja NO i PGI₂. EDHF predstavljaju kompezatorni mehanizam o endotelu ovisne vazodilatacije u stanjima kad je smanjena biodostupnost NO. Brojne su studije definirale nekoliko molekula ili posrednika koji djeluju kao EDHF u različitim vrstama i tkivima (51): K⁺ (52), metaboliti citokroma P450 (kao što je EETs, engl. epoxyeicosatrienoic acids) (53-55), produkti lipooksigenaze (56), sam NO (57), slobodni radikali kisika (H₂O₂) (58), cAMP (59), natriuretski peptid tip C (60) itd. Nadalje, endotelne su stanice mjesto proizvodnje i važnih endotelnih čimbenika kontrakcije (engl. endothelial-derived constricting factors, EDCF), od kojih su najmoćniji endotelin-1 (ET-1) i tromboksan (TXA₂). Nekoliko godina nakon otkrića NO, otkriven je vazokonstriktorni peptid kojega proizvodi vaskularni endotel i koji djeluje kao fiziološka protuteža djelovanju NO-a, ET-1 (61-63). Nekoliko čimbenika utječe na proizvodnju i otpuštanje ET-1, među kojima su žilni stres, angiotenzin II, trombin, adrenalin, oksidirani lipoproteini male gustoće i upalni citokini (64-70). U ljudi ET-1 povišuje krvni tlak i dovodi do vaskularne i miokardijalne hipertrofije, što su važni rizični čimbenici kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (71,72). Drugi je važan EDCF tromboksan (TXA₂) koji sintetiziraju COX-1 i tromboksan sintetaza u metabolizmu arahidonske kiseline. Ravnoteža između proizvodnje PGI₂ i TXA₂ sudjeluje u održavanju homeostaze u zdravim krvnim žilama. Povećana proizvodnja TXA₂ dovodi do vazokonstrikcije i agregacije trombocita povećavajući rizik od kardiovaskularnih incidenata (73,74). Prikazana složenost sustava vazoaktivnih tvari žilne stijenke, usprkos mnogobrojnim otvorenim pitanjima, ističe njihovu neupitnu ulogu u održavanju fiziološke ravnoteže i funkcije krvnih žila.

Endotelna disfunkcija (ED) danas je općeprihvaćeni termin koji opisuje stanje oštećenoga endotela, odnosno njegove poremećene funkcije. Takav poremećaj endotela

obuhvaća niz patofizioloških stanja, u rasponu od početne lokalizirane mehaničke ozljede žilne intime (ED u užem smislu) do neprimjerene, perzistentne, globalne endotelne aktivacije važne za razvoj brojnih klinički manifestnih patoloških stanja (21). Osnovu nastanka endotelne disfunkcije čini neprimjerena aktivacija endotela – nespecifična ekspresija endotelnih aktivacijskih antigena koja nastaje pod utjecajem različitih štetnih podražaja, te razvoj i koordinirana regresija svih pojedinačnih svojstava i sastavnica disfunkcionalnoga endotela (75). Dok je fenotip neaktivirane, “mirne” endotelne stanice antikoagulantni, protuupalni i vazodilatacijski, ED je promjena koju karakterizira proupalni, protrombotski i vazokonstriksijski fenotip (76-78). Kako je sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari i reguliranje krvnoga protoka ključna osobina zdravoga endotela, tako je neadekvatna raspoloživost NO-a jedno od glavnih obilježja ED-e, koja ujedno predstavlja vodeći mehanizam pojedinačnih endotelnih svojstava što ih objedinjuje sindrom ED. Nesrazmjer raspoloživosti NO-a i aktivnosti vazokonstriksijskih čimbenika, temelj je sklonosti vazokonstrikciji u ED-i, a on može biti uzrokovan nedostatkom NO-supstrata, L-arginina i/ili manjkom enzimskoga kofaktora tetrahidrobiopterina s pratećom nekompetentnošću eNOS-a. U posljednje vrijeme postaje jasno da su promjene u NO posredovanim procesima dijelom ovisne i o genetskim razlikama u ekspresiji aktivnosti eNOS-a (79), postraslacijskim modifikacijama enzima, a posebno se važnom čini uloga blokiranja NO kemijskim reakcijama s endogenim inhibitorima prije njegova učinka na ciljane molekule, u čemu vodeću ulogu vjerojatno imaju slobodni radikali kisika (80). Osim oštećenja o endotelu ovisne vazodilatacije krvnih žila, patofiziološke su posljedice razvoja ED ove: 1) abnormalna vaskularna reaktivnost i spazam krvnih žila koji su u razvijenoj ED-i izraženi kao paradoksalna vazokonstrikcija na acetilkolin, a navodi se i argininski paradoks koji izostankom očekivane vazodilatacije i hipotenzije, nakon infuzije L-arginina, izravno upućuje na endotelnu nesposobnost produkcije NO; 2) povećana propusnost endotela za makromolekule kao npr. lipoproteine, koja nastaje zbog redistribucije proteinskih molekula u mikrofilamentima s posljedičnom kontrakcijom i deformiranjem endotelnih stanica, prekidom bliskih staničnih kontakata i nastankom patoloških pukotina; 3) povećana ekspresija kemotaktičkih i adhezijskih molekula; 4) novačenje i akumulacija monocita/makrofaga u intimi krvnih žila; 5) poremećaj u regulaciji rasta i preživljavanja vaskulanih stanica – smanjena regeneracija endotelnih stanica i povećana proliferacija i migracija glatkih mišićnih stanica; 6) poremećaj hemostatske ravnoteže obilježene ekspresijom prokoagulacijskih molekula, stvaranjem trombina, agregacijom i adhezijom trombocita i odlaganja fibrina (81-83) (slika 1.).



Slika 1. Temeljno načelo vaskularne homeostaze.

Zdrav endotel iskazuje višestruka svojstva koja se razvojem endotelne disfunkcije redom pretvaraju u svoju negaciju, ali i istodobno regrediraju u slučaju poboljšanja endotelne funkcije.

Patofiziološki čimbenici koji dovode do nastanka ED-e i koji su posebno važni rizični čimbenici za nastanak, razvoj i progresiju kardiovaskularnih bolesti jesu ovi: 1) aktivacija citokina u inflamatornim procesima, 2) slobodni radikali kisika (ROS) i/ili oksidativni stres te glikozilacija metabolita koji su prisutni u dijabetesu i procesu starenja, 3) pušenje i hipertenzija, 4) kronična hiperhomocisteinemija i/ili hiperkolesterolemija i 5) povišena koncentracija plazmatskih oksidiranih lipoproteina male gustoće i njihova akumulacija u zidu krvne žile, a i infekcije bakterijama, virusima ili drugim patogenima (81-83, 84-88).

Kad postane detektabilan, endotelni je poremećaj već značajno uznapredovao i patofiziološki kompleksan. Njegove pojedinačne funkcionalne sastavnice obično se ne mogu jasno razlučiti, pa se ED tretira kao jedinstveno patološko stanje i procjenjuje analizom odabranih, reprezentativnih parametara. Kako je nedvojbeno dokazano da se radi o generaliziranoj vaskulopatiji, pojedini testovi endotelne funkcije iskazuju jednako značenje, bez obzira jesu li izvedeni na razini koronarnih ili perifernih arterija (21).

1.3. Metode koje se upotrebljavaju u procjeni vaskularne reaktivnosti i endotelne funkcije

Metode koje se trenutačno upotrebljavaju u ispitivanju endotelne funkcije jesu sljedeće: a) analiza bazalnih vrijednosti cirkulirajućih endotelnih biljega i njihove reaktivnosti u stimuliranim uvjetima, b) utvrđivanje cirkulirajućih endotelnih stanica u perifernoj krvi te c) mjerenje vazomocije arterija posredovano farmakološkim i endotelnim agensima (21).

1.3.1. Cirkulirajući endotelni biljezi

Proteklih godina velik broj cirkulirajućih endotelnih biljega promatran je kao parametar koji se mijenja prilikom nastanka i razvoja ED-e. Oštećenje endotela može imati za posljedicu otpuštanje raznih čimbenika ili promjene koncentracija postojećih. Cirkulirajući biljezi mogu se podijeliti u nekoliko skupina: vazodilatatori, vazokonstriktori, biljezi aktivacije i upale, biljezi hemostaze i drugi. Promjene vazoaktivnih agensa poput NO, nitrita i nitrata te ET-1 javljaju se u koronarnoj bolesti i hipertenziji (89-91). Dokazano je da su razine ET-1, snažnoga vazokonstriktora endotelno podrijetla, povišene u stanjima povezanim s endotelnom disfunkcijom poput ateroskleroze, hiperkolesterolemije i pušenja. Usprkos tomu, čini se da ET-1 nije osjetljiv niti specifičan biljeg krvožilne bolesti promatran samostalno. Pokazalo se da plazmatske razine nekoliko prokoagulantnih medijatora rastu sa stupnjem endotelno oštećenja. Von Willebrandov čimbenik (vWF), glikoprotein koji nastaje uglavnom u krvožilnim endotelnim stanicama, ima značajnu ulogu u hemostazi sudjelujući u koagulacijskoj kaskadi i u stvaranju trombocitnoga čepa na mjestu endotelno oštećenja. Prijašnja istraživanja pokazala su da povišene razine vWF mogu biti pretkazatelji kardiovaskularnih poremećaja u bolesnika s poznatim kardiovaskularnim bolestima. Jedan od češće rabljenih biljega endotelne disfunkcije jest obitelj staničnih adhezijskih molekula (CAMs) izraženih na površini endotelnih stanica. Te molekule posreduju vezanje i migraciju leukocita u subendotelni prostor tijekom upalnoga procesa u endotelu. Dobro su opisani među adhezijskim molekulama: međustanična adhezijska molekula 1 (ICAM-1), krvožilna adhezijska molekula 1 (VCAM-1), endotelno-leukocitna adhezijska molekula 2 (E-selektin) i P-selektin. Cirkulirajući topljivi oblici tih adhezijskih molekula zamijećeni su u plazmi i njihove razine rastu u upalnim stanjima. Nekoliko istraživanja pokazalo je da te molekule mogu imati ulogu biljega u endotelno oštećenju, oksidativnom stresu, aterosklerozi kao i povećanom riziku od kardiovaskularnih

komplikacija (92,93). Drugi biljeg upale, C reaktivni protein, najbolje je opisan među trenutačno dostupnim biljezima i ima potencijalnu ulogu biljega u kardiovaskularnim komplikacijama (94-96). Fosfolipaza A2 povezana s lipoproteinom (Lp-PLA2) koju stvaraju makrofagi, a potiče upalu stvaranjem lizofasfatidil kolina, supresijom endotelne NO sintetaze i regulacijom ekspresije CD40 liganda na T limfocitima, služi kao biljeg koronarne endotelne disfunkcije (97-99). Asimetrični dimetilarginin (ADMA), endogeni kompetitivni inhibitor NO sintetaze, smatra se jednim od biljega endotelnog oštećenja kod osoba s hiperkolesterolemijom i aterosklerozom (100-102). Raste broj novih biljega poput endokana (službeno zvan endotel specifična molekula 1, ESM-1), proteoglikana izraženoga na krvožilnom endotelu koji pokazuje jasno povišenu izraženost i povišene serumske razine kod tumora u ljudi (103).

Razlog tako velikom broju cirkulirajućih biljega endotelne disfunkcije koji je još uvijek u porastu, jest detaljno otkrivanje endotelne funkcije, a i razumijevanje patogeneze njezina oštećenja. Mehanizmi koji uzrokuju promjene pojedinih biljega endotelne disfunkcije još su nepoznati i potpuno nerazumljivi. Za razjašnjavanje tih mehanizama i odabir odgovarajućih biljega endotelne disfunkcije polazišna točka trebala bi biti genetička, proteomska i metabolička istraživanja.

1.3.2. Cirkulirajuće endotelne stanice

Cirkulirajuće endotelne stanice (CECs) noviji su biljezi endotelne disfunkcije. Mogu biti izdvojene iz periferne krvi u mnogim patološkim stanjima koja uključuju neprimjerenu aktivaciju endotela kao što su akutni infarkt miokarda, nestabilna angina pectoris i čitav spektar drugih sistemskih upalnih bolesti. CECs se ne mogu pronaći u perifernoj krvi zdravih ljudi (104-106). Nadalje, povišenje cirkulirajućih endotelnih mikročestica zabilježeno tijekom akutnoga koronarnog sindroma i hipertenzije može biti rani biljeg endotelnog oštećenja (107-109). Također, endotelne progenitorske stanice (EPC) smatraju se indikatorima endotelnog statusa u ljudi. Te stanice podrijetlom iz koštane srži uključene su u obnovu endotela u stanjima endotelnog oštećenja. Dugotrajno odlaganje EPC-a uz nazočnost kardiovaskularnih rizičnih čimbenika moglo bi imati štetan učinak na krvožilnu homeostazu (110,111).

1.3.3. Mjerenje vaskularne reaktivnosti i perifernog protoka krvi potaknutoga farmakološkim i endogenim agensima

Postupci istraživanja reaktivnosti krvnih žila najčešće su uporabljene i najbolje dokumentirane metode ispitivanja endotelne funkcije. Brojne su metode koje mjere protok krvi i njegove promjene u konduktivnim i otporničkim arterijama, te u mikrocirkulaciji.

Mjerenje protoka metodom Laser Dopplera. Najčešće primijenjena metoda za procjenu endotelne funkcije u mikrocirkulaciji jest mjerenje protoka laser Dopplerom (engl. Laser Doppler Flowmetry, LDF). Metoda radi na osnovi procjene protoka u mikrocirkulacijskoj vaskulaturi kože preko laserske zrake koja se reflektira od eritrocita u mikrocirkulaciji te se na temelju promjene valne duljine nakon odbijanja (Dopplerov efekt) računalnim programima određuje veličina protoka, a iskazuje se u arbitrarnim jedinicama (engl. perfusion units, PU) i prikazuje u obliku krivulje. Ta je metoda posljednjih godina dobila svoje nove i različite aplikacije, od mjerenja protoka jednom laserskom sondom, s primjenom iontoforeze ili mikrodijalize ili bez njih, do mogućnosti prikaza mikrocirkulacijskoga protoka čitave podlaktice. Kako bi se odredila funkcija endotela, LDF-om se mjeri protok u odgovoru na različite stimuluse. Postokluzivna reaktivna hiperemija (PORH) u mikrocirkulaciji kože odnosi se na iznad bazalnih vrijednosti povećan protok koji se javlja kao odgovor na otpuštanje kratkotrajne okluzije arterijskoga protoka. Četiri su važna čimbenika uključena u mehanizam nastanka postokluzivne hiperemije: vazodilatatorni metaboliti ishemije, endotelni vazodilatatori, odgovor glatkoga mišićja krvne žile i senzorički živci. Najvažnije su prednosti metode LDF: 1) neinvazivna je i ne izaziva neugodu u ispitanika i 2) osjetljiva je za detekciju i kvantifikaciju relativnih promjena protoka u mikrocirkulaciji kože na zadani stimulus (vaskularna okluzija, promjene temperature, farmakološki agenti itd.) (112).

Venska okluzivna pletizmografija. Metoda mjerenja protoka i procjene endotelne funkcije mikrocirkulacije koja se temelji na zaustavljanju povratka venske krvi iz podlaktice, uz održan arterijski priljev krvi u podlakticu, što dovodi do linearnoga povećanja krvnoga protoka u određenom vremenu a koji je proporcionalan arterijskom pritoku krvi. Okluzija venske cirkulacije podlaktice postiže se napuhivanjem manžete iznad vrijednosti dijastoličkoga tlaka, dok se drugom manžetom isključuje protok krvi kroz šaku kako bi se smanjile promjene protoka krvi ovisne o temperaturi. Promjene protoka bilježe

se promjenom električnoga otpora u pletizmografu postavljenom oko najširega dijela podlaktice. Tom metodom mogu se mjeriti promjene protoka i endotelne funkcije u mikrocirkulaciji podlaktice tijekom infuzije različitih vazoaktivnih agenata kao što su acetilkolin, bradikinin, indometacin itd (113).

Ultrazvučni test protokolom posredovane dilatacije perifernih arterija (engl. Flow Mediated Dilation, FMD). FMD je tehnika koja se temelji na izazivanju vazodilatacije uslijed povećanja protoka krvi kroz arteriju – povećan protok izaziva žilni stres endotela s posljedičnom stimulacijom endotelnih stanica na povećano otpuštanje NO-a (114). Kao što je već bilo naglašeno, smanjena vazodilatacija koja se javlja zbog povećanoga žilnog stresa označuje poremećaj biodostupnosti NO i prisutnost endotelne disfunkcije (115). Žilni se stres izaziva okluzijom protoka manžetom postavljenom na podlakticu, a promjer brahijalne arterije mjeri se visokorezolucijskim ultrazvučnim aparatom. Promjer krvne žile mjeri se tijekom bazalnih uvjeta, tijekom 5 minuta žilne okluzije i 3 minute reaktivne hiperemije. FMD se izražava kao maksimalni postotak dilatacije tijekom reaktivne hiperemije u odnosu na bazični promjer krvne žile. Za određivanje endotel-neovisne dilatacije krvne žile ispitanicima se sublingvalno aplicira natrijev nitroprusid te se bilježi najveća promjena promjera krvne žile tijekom 5 minuta od aplikacije lijeka. FMD se obično mjeri na brahijalnoj arteriji, iako se može određivati i na radijalnoj ili femoralnoj arteriji (113,116-118).

Određivanje elastičnosti krvnih žila (eng. arterial stiffness). Prilikom svakoga otkucaja srca šalje se tlačni val kroz vaskulaturu, a popustljiv arterijski zid služi kako bi se ublažile oscilacije tlaka i na taj se način omogućio miran protok krvi do svih tkiva. Tlačni se val reflektira natrag k srcu kada dosegne grananje krvnih žila u vaskulaturi. U zdravih pojedinaca taj reflektirani tlačni val stiže do srca za vrijeme dijastole kako bi pomogao punjenje koronarnih krvnih žila. Ipak, u pojedinaca sa smanjenom elastičnošću arterija, tlačni se val vraća k srcu mnogo brže i stiže do srca za vrijeme sistole. Time se povećava afterload koji srce mora svladati kako bi se otvorili aortalni polumjesečasti zalisci. Kao posljedica takvih promjena dolazi do nastanka komplikacija smanjene elastičnosti krvnih žila kao što su angina i/ili infarkt miokarda ili hipertrofija lijevoga ventrikula koja može rezultirati zatajenjem srca (119). Smanjenje elastičnosti zida krvne žile može se dogoditi uslijed smanjene proizvodnje NO-a u endotelnim stanicama, gubitka tonusa glatkoga mišićja krvne žile, degeneracije vlakana elastina i povećanoga odlaganja kolagena u zidu krvne žile (120). Kao posljedica, elastičnost je krvnih žila ovisna o funkcionalnim i

strukturnim promjenama u vaskulaturi. Za procjenu elastičnosti perifernih krvnih žila služe brojne neinvazivne metode. Najčešće su uporabljivane analiza pulsno vala (eng. pulse wave analysis, PWA) i određivanje brzine pulsno vala (eng. pulse wave velocity, PWV) zbog njihove reproducibilnosti i lakoće izvođenja (121). Pokazano je da su ti testovi povezani s koronarnom mikrovaskularnom endotelnom funkcijom (122). PWA se temelji na bilježenju valova krvnoga tlaka radijalne arterije pomoću odgovarajućega pretvarača stavljenoga na mjesto gdje su pulsni valovi najjači. Kako bi se izmjerila PWV, arterijski pulsni valovi simultano se bilježe na dvije arterije, najčešće karotidnoj i radijalnoj. Određuje se udaljenost između dvaju mjesta na kojima se bilježe pulsni valovi te se izračunava vrijeme potrebno da pulsni val dođe od jedne do druge točke mjerenja. Što je PWV veća, veća je refleksija pulsno vala natrag k srcu što upućuje na smanjenu elastičnost krvnih žila (123).

Određivanje debljine intima-media karotidne arterije (end. carotid intima-media thickness, cIMT). Tom metodom procjenjuje se debljina medije vaskularne stijenke karotidne arterije koja je prihvaćeni pretkazatelj kardijalnih incidenata u pacijenata koji imaju rani stadij ateroskleroze te dobar prognostički čimbenik za razvoj restenoze u pacijenata koji su bili na perkutanoj koronarnoj intervenciji (124, 125). Studije su pokazale da su promjene cIMT-a posljedica smanjenja biodostupnosti NO-a te povišenje razine ET-1, koji s vremenom rezultiraju povećanom proizvodnjom upalnih citokina, slobodnih radikala, adhezijskih molekula i čimbenika zgrušavanja koji vode do proliferacije glatkoga mišićja zida krvne žile (126,127). cIMT se uobičajno određuje na zajedničkoj karotidnoj arteriji, unutarnjoj karotidnoj arteriji i točkama bifurkacije (128), a svaka točka mjerenja ima slična svojstva za procjenu budućih kardiovaskularnih incidenata (129).

1.4. Sol-osjetljivost i sol-rezistentnost

Brojna istraživanja koja su se bavila utjecajem soli na promjene krvnoga tlaka došla su do zaključka da u općoj populaciji postoji određeni broj ljudi koji na povećanje unosa soli odgovaraju povećanjem krvnoga tlaka dok u ostatka takva promjena nije utvrđena. Iz tog zapažanja proizašla su dva termina, odnosno podjela populacije na “sol-osjetljive” i na “sol-rezistentne” pojedince. “Sol-osjetljivost” se manifestira kao značajna promjena krvnoga tlaka u odgovoru na akutne ili kronične promjene unosa soli u organizam te je definirana kao tendencija smanjenja krvnog tlaka prilikom smanjenja i povišenja krvnoga tlaka prilikom povećanja unosa soli u organizam. Kriterij za proglašavanje pojedinca “sol-

osjetljivim” jest promjena krvnog tlaka između stanja povećanog unosa soli (unos 2 L saline) i stanja smanjenog unosa soli (nisko-slana dijeta, 10 mmol Na na dan + furosemid per os) za više od 10 mmHg i takvi se pojedinci proglašavaju “sol-osjetljivi”, a ako je promjena krvnog tlaka manja od 5 mmHg, tada se proglašavaju “sol-rezistentni”. Koristeći tu definiciju, velika istraživanja i meta analize pokazale su da se u određenoj populaciji 26% normotenzivnih osoba i 51% hipertenzivnih pojedinaca se može smatrati “sol-osjetljivim” (130).

Ipak, kako je već navedeno, postoji sve više dokaza kako sol ima nedvojben utjecaj na krvožilni sustav koji je neovisan o promjenama krvnog tlaka (16). Zbog toga te termine treba prihvatiti uvjetno. Dakle, podjela na “sol-osjetljive” i “sol-rezistente” u daljnjem tekstu i u citiranim istraživanjima odnosi se na utjecaj soli na promjene krvnog tlaka, a u svjetlu novih otkrića o utjecaju soli na vaskularnu reaktivnost i endotelnu funkciju postavlja se pitanje: Nije li ipak svaki pojedinac “sol-osjetljiv”?

1.5. Studije na animalnim modelima

Studije na animalnim modelima bile su početni korak u nastojanju razjašnjavanja pitanja: 1) kojim mehanizmima sol djeluje na pojedine krvne žile i njihovu funkciju, 2) na koje krvne žile i u kojem će vaskularnom slivu taj štetan utjecaj biti vidljiv te 3) koje je vremensko razdoblje potrebno da se visok unos soli u organizam odrazi na vaskularnu funkciju.

Navedene su studije nedvojbeno pokazale da povećana koncentracija soli u svakodnevnoj prehrani štetno djeluje i na strukturu i na funkciju krvnih žila neovisno o patogenezi hipertenzije. U normotenzivnih životinja hranjenih dijetom s visokim udjelom soli (HSD) dokazano je oštećenje i prorjeđenje mikrocirkulacije, disocijacija medije i intime krvnih žila, remodeliranje vaskulature te potenciranje vazokonstriktivnih a dramatično smanjenje relaksacijskih odgovora krvnih žila. Upravo zbog toga je velik broj studija na animalnim modelima fokusiran na rasvjetljivanje mehanizama kojima HSD dovodi do poremećaja reaktivnosti krvnih žila na različite vazodilatatorne i vazokonstriktorske stimuluse (131-133). Jedan od glavnih uzroka takve poremećene relaksacije krvnih žila jest razvoj poremećene funkcije endotela, koja normalno predstavlja kritičnu ulogu u regulaciji vaskularnoga tonusa tijekom proizvodnje vazodilatatornih i vazokonstriktorskih agensa (22, 28-31). Poremećaj o endotelu ovisne vazodilatacije krvnih

žila životinja koje su bile na HSD protokolu događa se bilo zato što je nastupio poremećaj u proizvodnji endotelnih vazodilatacijskih supstanci bilo zbog toga što kao odgovor na vazoaktivne stimuluse (koji normalno relaksiraju krvne žile) dolazi do otpuštanja vazokonstriktorskih supstanci. Studije su pokazale da je ključan spoj koji čini poveznicu između visokoga unosa soli i razvoja endotelne disfunkcije angiotenzin II (ANG II). Unos hrane s visokim udjelom soli dovodi do smanjenja koncentracije ANG II u plazmi. Taj fiziološki odgovor ne samo da ima kritičnu ulogu u ekskreciji povišenih koncentracija natrija iz organizma već se smatra da upravo tako snižene vrijednosti ANG II dovode do povećanja oksidativnoga stresa i oštećenja vaskularne reaktivnosti u stanjima visokog unosa soli u organizam (134-136). Ti rezultati potvrđeni su daljnim istraživanjima koja su pokazala da intravenska infuzija subpresorskih doza ANG II tijekom visokoslane dijeta dovodi do uspostavljanja normalne vaskularne relaksacije i smanjivanja povišenih vrijednosti slobodnih radikala kisika na normalne vrijednosti (137).

Studije na animalnim modelima ispitivale su utjecaj visokoga unosa soli u organizam na krvne žile različitih vaskularnih slivova. Tako su kao eksperimentalni modeli korišteni aortni prsrenovi, cerebralne arterije, arterije skeletnih mišića i krvne žile mikrocirkulacije najčešće korištenoga animalnog modela u ovim istraživanjima – štakora. Rezultati navedenih studija pokazali su značajno oštećenu vaskularnu reaktivnost na različite fiziološke stimuluse i u provodničkim krvnim žilama, a i u otporničkim krvnim žilama te u mikrocirkulaciji (131-137).

Animalne studije fokusirale su se na vremenski tijek potreban da manipulacije i promjene količine soli u svakodnevnoj prehrani dovedu do patoloških promjena – ponajprije poremećaja reaktivnosti krvnih žila uzrokovanih razvojem endotelne funkcije. Vrlo važan i zapravo zapanjujuć rezultat animalnih studija bio je taj da već i akutan unos visokih koncentracija soli (tijekom tri dana) dovodi do oštećenja vaskularne reaktivnosti i poremećenoga vazodilatacijskog odgovora krvnih žila koji su prvotno dokazano bili prisutni nakon dužih razdoblja visokoslane dijeta (tijekom četiri tjedna) te da je potreban gotovo jednak vremenski raspon unosa dijeta s niskim udjelom soli kako bi se povratila normalna reaktivnost oštećenih krvnih žila, bilo akutnim bilo kroničnim unosom visokih koncentracija soli u organizam (133).

Otkrića studija na animalnim modelima su pokazala da utjecaj dijeta s visokim udjelom soli na organizam treba početi promatrati izvan standardnih okvira i poveznice sol – krvni tlak, te da treba uzeti u obzir spoznaje da već i kratka razdoblja unosa visokih doza soli dovode do isprva nemanifestirane i reverzibilne lokalizirane mehaničke ozljede žilne

intime (ED u užem smislu), ali koja kasnije vode do neprimjerene, perzistentne, globalne endotelne aktivacije važne za razvoj brojnih klinički manifestnih patoloških stanja. Ti rezultati još više naglašavaju važnost razumijevanja učinaka visokih doza soli u prehrani na vaskularnu funkciju upravo u normotenzivnih, kardiovaskularno nekompromitiranih zdravih ljudi te su provođenje i rezultati takvih studija tema od velikoga interesa.

1.6. Utjecaj kratkotrajnih promjena količine soli u svakodnevnoj prehrani na vaskularnu funkciju – studije na humanom modelu

Početni koraci u razjašnjavanju učinkakratkotrajnih promjena količine soli u svakodnevnoj prehrani na vaskularnu funkciju učinjeni su trima istraživanjima koja su proučavala učinak unosa soli na krvožilne odgovore ovisne, ali i neovisne o endotelu. Stein i suradnici (138) istraživali su zdrave ispitanike tijekom prehrane s visokim i s niskim udjelom soli. Vazodilatacijski se odgovor krvnih žila podlaktice na endotelni medijator metakolin nije značajno smanjio po završetku razdoblja prehrane s visokim udjelom soli. S druge strane, vazodilatacija potaknuta natrijevim nitroprusidom, koja nije odgovor posredovan endotelnim stanicama, bila je inducirana slanim režimom. Dakle, Stein i suradnici pokazali su da je unos soli povećao vazodilatacijski odgovor neovisan o endotelu, dok o endotelu ovisni vaskularni odgovor nije bio promijenjen. Miyoshi i suradnici (139) prikazali su pogoršanje vazodilatacije potaknute acetilkolinom kod na sol osjetljivih pacijenata s esencijalnom hipertenzijom u usporedbi s na sol rezistentnim hipertenzivnim pacijentima, dok utjecaj L-NMMA na bazični protok krvnih žila podlaktice nije pokazao razliku između skupina. Bragulat i suradnici istraživali su endotelnu vazodilataciju u 45 hipertenzivnih pacijenata razdijeljenih prema osjetljivosti na sol. Naime, prijašnja su istraživanja pokazala pogoršanje vazodilatacije ovisne o endotelu kod pacijenata s esencijalnom hipertenzijom osjetljivih na sol u usporedbi s istima, ali neosjetljivima na sol. Za razliku od rezultata Miyoshi i suradnika, Bragulat i suradnici opisali su značajne razlike između skupina kod vazodilatacije potaknute acetilkolinom nakon apliciranja L-NMMA. Naime, primjena L-NMMA smanjila je maksimalnu vazodilataciju ovisnu o endotelu na 29% kod pacijenata neosjetljivih na sol, dok je kod pacijenata osjetljivih na sol maksimalni odgovor snižen na samo 13%. Snižen odgovor na acetilkolin, a i umanjeni utjecaj L-NMMA kod hipertenzivnih pacijenata osjetljivih na sol snažno upućuje na pogoršanje L-arginin-NO puta (140). Nažalost, humana istraživanja teško rasvjetljuju prirodu toga pogoršanja na molekularnoj razini, stoga mehanizam kojim sol djeluje na endotel i funkciju krvnih žila ostaje nepoznat. Rezultati navedenih istraživanja upućuju da smanjeno stvaranje

NO-a ili njegova povećana degradacija uslijed oksidativnog stresa, ili pak oboje, mogu biti uključeni u razvoj ED..

Daljnjim istraživanjima na humanom modelu nastavilo se proučavati utjecaj visokoga unosa soli na vaskularnu funkciju različitih vaskularnih slivova primjenom različitih istraživačkih metoda. Tako su Dishy i suradnici pokazali da visok unos soli smanjuje proizvodnju NO-a i u osjetljivih na sol i u neosjetljivih na sol normotenzivnih ispitanika, što je neovisan učinak o promjeni krvnoga tlaka, ali da nema utjecaj na NO-posredovanu vazodilataciju krvnih žila mjerenu metodom venske pletizmografije u odgovoru na mentalni stres (141). Također, Higashi i suradnici svojom su studijom demonstrirali kako visok unos soli u organizam nema utjecaj na o endotelu ovisnu vazodilataciju mjerenu metodom venske pletizmografije ni u osjetljivih na sol ni u neosjetljivih na sol pacijenata koji boluju od esencijalne hipertenzije (142). U kasnijim studijama istraživači su se posvetili upravo problemu utjecaja visokoga unosa soli u svakodnevnoj prehrani u mladoj zdravoj normotenzivnoj populaciji. Tzemos i suradnici pokazali su kako tjedan dana dijete s visokim udjelom soli ima štetan učinak na protokomposredovanu dilataciju brahijalne arterije mjerenu ultrazvukom u populaciji zdravih mladih muškaraca (143). Gotovo identične rezultate pokazali su Liu i suradnici u svojoj studiji također učinjenoj u zdravoj mladoj populaciji (144). Nadalje, Starmans-Kool i suradnici pokazali su da dva tjedna dijete s visokim udjelom soli dovodi do značajnoga povišenja krvnoga tlaka u karotidnoj arteriji u odnosu na krvni tlak u brahijalnoj arteriji i do povećane refleksije pulsnoga vala u populaciji normotenzivnih zdravih muškaraca (145). Kako je postojao sve veći broj dokaza da već kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli ima štetan učinak na vaskularnu funkciju, neki istraživači su otišli toliko daleko da su proučavali učinak samo jednoga obroka bogatoga solju na vaskularnu funkciju. Dickinson i suradnici u rezultatima svoje studije prikazali su smanjenu protokom posredovanu dilataciju brahijalne arterije mjerenu ultrazvukom nakon samo jednoga visokoslanoga obroka (146).

Ipak, kako su rezultati navedenih studija nekonzistentni, a mehanizmi kojima sol djeluje na vaskularnu funkciju u različitim dijelovima krvožilnoga sustava i vrijeme koje je potrebno za razvoj navedenih promjena, još uvijek nerazjašnjeni, riječ je o vrlo aktualnom području interesa kojim se i dalje bave brojne istraživačke skupine.

Pored navedenih istraživanja o utjecaju prehrane bogate solju na vaskularnu funkciju, postojalo je veliko zanimanje za pitanje kako smanjenje udjela soli u

svakodnevnoj prehrani može imati koristan učinak na krvožilni sustav. Najveća i najpoznatija je studija INTERSALT koja je proučavala utjecaj dijeta sa smanjenim udjelom soli na krvni tlak. U istraživanju INTERSALT primijenjene su dotada najbolje metode mjerenja krvnoga tlaka i procjene unosa soli (ekskrecija natrija u 24-satnom uzorku urina) u velikom uzorku (gotovo 11000) muškaraca i žena u dobi od 20 do 59 godina iz 52 središta 39 različitih zemalja (147). Studija INTERSALT je pokazala da nema značajne povezanosti između ekskrecije natrija u 24-satnom urinu i krvnoga tlaka tijekom analize podataka priskrbljenih iz 48 akulturiranih populacija. Slaba, ali značajna pozitivna povezanost ekskrecije natrija i krvnoga tlaka pojavila se tek kada su u analizu uključena četiri središta s neakulturiranim populacijama (plemena Yanomamo i Xingu u Brazilu te plemena Kenya i Papua u Novoj Gvineji) koje su imale izrazito nizak unos soli i alkohola, a i nisku tjelesnu masu i krvni tlak. Ponovna analiza podataka koju su obavili istraživači INTERSALT-a pokazala je snažniju povezanost unosa soli i krvnog tlaka (148), no često je bila kritizirana na osnovi nepodržanih podataka i upitnih statističkih metoda (149). Dakle, dotada najsuvremenije, najopsežnije i najkontroliranije istraživanje povezanosti unosa soli i krvnoga tlaka pokazalo je rezultate koji su bili tema kontroverzi i raznovrsnih interpretacija. Drugom važnom studijom pod nazivom Prehrambeni pristup zaustavljanju hipertenzije (DASH, engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension) istraživači su pružili daljnje dokaze o heterogenosti osjetljivosti na sol različitih populacija (150-153). Kada je prehrambeni unos natrija snižen na približno 100 mmol (s visokoga na nizak unos soli) kod osoba koje su bile na kontroliranoj prehrani, sistolički tlak snizio se ukupno 6.7 mmHg u prosjeku, 8.3 mmHg u hipertenzivnih osoba te 5.6 mmHg u normotenzivnih osoba ($p < 0,05$); snizio se 7.5 mmHg kod sudionika starijih od 45 godina, dok se kod onih mlađih snizio za 5.3 mmHg ($p < 0,05$); te kod afroameričkih sudionika za 8.0 mmHg, a u ostalih etničkih skupina snizio se za 5.1 mmHg ($p < 0,01$) (151). Takvi odgovori na smanjenje unosa soli poprilično su ublaženi prehrambenim protokolom DASH, koji je uključivao svakodnevno nekoliko porcija voća, povrća te niskomasnih mliječnih proizvoda. Istraživačka skupina studije DASH ispitala je varijabilnost i konzistentnost individualnoga odgovora sistoličkoga tlaka na promjene u unosu soli (152). Otkrili su nekonzistentne i nereproducibilne odgovore sistoličkoga tlaka na promjenu unosa soli tijekom određenoga vremena. Ukupno 29% sudionika označeno je osjetljivima na sol, 28% pokazalo se neosjetljivima na sol, dok je ostatak pokazao nekonzistentan odgovor. Iz tih podataka autori su zaključili da označavanje bolesnika prema odgovoru na sol i nema naročitu vrijednost ako se promatra s kliničkoga stajališta ili stajališta javnoga zdravstva.

Kasnije analize u 32 randomizirane studije koje su uključivale 2635 ispitanika pokazale su da umjereno smanjenje soli u hrani snižuje sistolički i dijastolički krvni tlak u vremenu od nekoliko tjedana do nekoliko godina. Veličina takve analize i doneseni zaključci slični su onima iz studije INTERSALT. Osim istraživanja učinka smanjenoga unosa soli na krvni tlak neke su se studije bavile pitanjem utjecaja smanjenoga unosa soli na vaskularnu funkciju. Tako su Dickinson i suradnici pokazali da niskosлана dijeta ima pozitivan utjecaj na protokom posredovanu dilataciju brahijalne arterije mjerenu ultrazvukom u populaciji zdravih normotenzivnih ljudi, neovisno o promjeni krvnoga tlaka (154). Ipak, rezultati studija koje su se bavile tim pitanjem nekonzistentni su te su potrebna daljnja istraživanjima kako bi se utvrdio učinak smanjenoga unosa soli na vaskularnu funkciju te i vrijeme potrebno da se te promjene dogode.

1.7. Izbor ispitanica - populacija zdravih mladih žena

Sve do nedavno sva istraživanja provodila su se na muškarcima kako bi se uklonio utjecaj brojnih fizioloških promjena vezanih uz menstrualni ciklus i unatoč tomu što su ti podatci uvelike unaprijedili naše razumijevanje fiziologije i patofiziologije, sada znamo da su takva istraživanja ograničila pogled na mehanizme regulacije organa i tkivnih funkcija te dijagnostiku i brigu o pacijentima. Poznato je da spolne razlike postoje i u incidenciji, prevalenciji, dijagnostici i ishodu liječenja kardiovaskularnih bolesti (155). Neki dokazi čak govore kako se klasični čimbenici rizika ne mogu primijeniti na žene jednako kao na muškarce, osobito gledajući koronarne kalcifikacije, dijastoličko zatajivanje srca i mikrovaskularnu bolest (155, 156). Uzevši to u obzir, za ovo istraživanje odabrana je populacija mladih zdravih žena u nastojanju da se pripomogne razjašnjavanje fiziologije i patofiziologije ženskoga krvožilnog sustava.

1.8. Uloga vazokonstriktornih prostaglandina u nastanku i razvoju mikrovaskularne disfunkcije izazvane dijetom s visokim udjelom soli

Dakle, proučavajući svu postojeću građu o utjecaju soli na vaskularnu funkciju, ovim se istraživanjem htjelo pridonijeti razjašnjavanju učinaka koje sol ima na krvožilni sustav neovisnim o promjenama krvnoga tlaka.

Kao što je već u uvodu navedeno, dnevni unos soli varira među različitim populacijama u svijetu, od 4 g soli dnevno kod Eskima do 27 g soli na dan u sjeveroistočnom Japanu. U najrazvijenijim zemljama, dnevni unos soli varira od 6 do 12 g soli na dan, što je još uvijek 1.5 do 2.5 puta više od preporučene količine od 5 grama dnevno

(5). Općeprihvaćena je činjenica, potvrđena brojnim istraživanjima i metaanalizama, da je visok unos soli prehranom esencijalan čimbenik rizika u razvoju i napredovanju hipertenzije (4,5,17-19, 157), dok smanjenje soli u prehrani snižava krvni tlak u mnogih hipertenzivnih pacijenata (151). Nadalje, brojna istraživanja na eksperimentalnim životinjama pokazala su kako promjena unosa soli značajno mijenja krvožilnu reaktivnost na razne fiziološke stimuluse u konduktivnim krvnim žilama, otporničkim arterijama kao i u mikrocirkulaciji (134, 158, 159), što bi moglo pridonijeti povišenom krvnom tlaku. Velik prinos ovoj temi donijela je studija Weinbergera i suradnika, kojisu pokazali da su neki od štetnih učinaka prehrane s velikim udjelom soli neovisni o povišenom krvnom tlaku i mogu se javiti i kod normotenzivnih pojedinaca (16). Visok unos soli i/ili osjetljivost na sol povezani su s pogoršanom funkcijom endotela (17,19) te na sol osjetljivi pacijenti ne bi mogli biti u mogućnosti regulirati stvaranje NO-a tijekom povećanoga unosa soli (19).

Ipak, rezultati istraživanja koja su ispitivala učinak akutnoga povećanog unosa soli na endotelnu funkciju i krvnožilnu reaktivnost kod mladih zdravih pojedinaca još su oskudni i nedosljedni. Kao što je već navedeno, pojedini autori pokazali su da je unos soli kod mladih zdravih pojedinaca povezan sa smanjenom bioaktivnošću krvožilnoga NO-a (143,144), dok drugi nisu uspjeli dokazati utjecaj unosa soli na endotelnu krvožilnu funkciju ovisnu o NO-u (138,141,142). Dakle, mehanizmi kojima visok unos soli (HSD) utječe na endotel još uvijek nisu poznati, a ni vrijeme potrebno da se takve patološke promjene dogode. Prijašnja istraživanja na različitim vrstama štakora pokazala su da čak i kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli pogoršava krvožilnu funkciju i mijenja odgovore na vazokonstriktore, a i vazodilatatore u krvožilju (134,158,159,160-162). Nadalje, za obnavljanje normalnih mehanizama krvožilne relaksacije trebalo je 4 tjedna dijete s niskim udjelom soli (LSD) nakon akutne (tijekom tri dana) kao i kronične (tijekom četiri tjedna) primjene visokih doza soli (133). Proučavajući mehanizme koji mogu biti uključeni u pogoršanje krvožilne funkcije uslijed visokoga unosa soli, neka istraživanja naglašavaju da prekomjerno stvaranje vazokonstriktornih čimbenika, poput TXA2 ciklooksigenaznoga podrijetla, može pridonijeti pogoršanoj relaksaciji tijekom odgovora na vazodilatacijske stimuluse ovisne o endotelu kod štakora koji su bili na dijeti s visokim udjelom soli (159). Te spoznaje naglašavaju važnost razumijevanja učinka visokoslane prehrane na mikrovaskularnu funkciju kod normotenzivnih zdravih pojedinaca, naročito u ranim stadijima.

Široko je prihvaćena činjenica kako se endotelna disfunkcija razvija u odgovoru na kardiovaskularne rizične čimbenike i prethodi razvoju ateroskleroze. ED podrazumijeva umanjeno stvaranje ili dostupnost NO-a i/ili neravnoteža u relativnom udjelu čimbenika relaksacije i kontrakcije podrijetlom iz endotela, što rezultira pogoršanom krvožilnom reaktivnošću te djelomično sudjeluje u procesu stvaranja lezija, promičući rane i kasne mehanizme nastanka ateroskleroze (87,163-165).

Stoga, kako bi se ispitali ti složeni događaji u razvitku endotelne disfunkcije, mnoštvo je dijagnostičkih modaliteta podijeljeno u dvije velike kategorije biljega za ispitivanje funkcije endotela te zamjenskih biljega. Njihova kombinacija omogućuje temelj za opsežniju procjenu kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. LDF kože učestalo je primjenjivana metoda za procjenu perifernoga protoka krvi i mikrovaskularne funkcije u ljudi (21,112,166,167). Ta metoda omogućuje prikupljanje važnih kliničkih podataka na neinvazivan način kako bi se procijenilo oštećenje mikrocirkulacije u raznim patološkim stanjima (168,169), uključujući i unos soli. Različite skupine staničnih adhezijskih molekula (CAMs) poput selektina (E-selektin) i imunoglobulina (ICAM-1 i VCAM-1) izražene su na aktiviranim endotelnim stanicama. Kada je prekomjerno izražen na aktiviranim endotelnim stanicama, CAMs su podvrgnute rasipanju i njihovi topljivi oblici (sCAMs) mogu se detektirati u serumu te se smatraju biljezima aktivnosti ili oštećenja endotelnih stanica (163,170). Endokan (ESM-1) je proteoglikan koji stvaraju endotelne stanice i budući da je njegova plazmatska koncentracija povećana u akutnim i teškim upalama, može se smatrati biljekom aktivacije endotela (170-172).

1.9. Uloga reninsko angiotenzinskoga sustava u regulaciji mikrovaskularne funkcije tijekom kratkotrajnih promjena količine soli u svakodnevnoj prehrani

Reninsko angiotenzinski sustav (RAS) glavni je homeostatski sustav koji kontrolira volumen tjelesnih tekućina, ravnotežu elektrolita, krvni tlak, neuronalne i endokrine funkcije vezane uz kardiovaskularnu kontrolu te ima ključnu ulogu u održavanju arteriolarne građe i krvožilne reaktivnosti (157). RAS ostvaruje svoje učinke preko efektorne molekule ANG II, koja se veže na specifične transmembranske angiotenzinske receptore smještene u raznim tkivima, uključujući i krvožilje (157,173,174). Ključan enzim koji sudjeluje u sintezi ANG-a II jest renin. Renin je aspartilna proteaza koja se sintetizira i otpušta iz jukstaglomerularnih stanica lokaliziranih u aferentnim i eferentnim arteriolama bubrežnih glomerula u odgovoru na različite stimuluse, uključujući i smanjen tlak protoka

krvi kroz bubrege, povećanu aktivnost simpatičkoga sustava bubrega i smanjen dotok NaCl u makulu densu jukstaglomerularnoga aparata. Renin razlaže angiotenzinogen, glikoprotein građen od 429 aminokiselina ($M_r=53-57$ kD) i sintetiziran u hepatocitima, na dekaeptid angiotenzin I (ANG I), kojega u idućem procesu angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE) prevodi u angiotenzin II (ANG II), potentni vazoaktivni oktapeptid (157).

Dosada su identificirana najmanje dva angiotenzinska receptora: AT1 i AT2 (175-177). Glavnina poznatih učinaka angiotenzina II, kao što je vazokonstrikcija, posredovana je stimulacijom receptora AT1. Međutim, nedave spoznaje pokazuju da receptor AT2 nema samo učinke suprotne receptoru AT1, nego i jedinstvene učinke, kao što je vazodilatacija (178). Receptor AT1 izražen je posvuda u krvnim žilama, dok je receptor AT2 slabije izražen u velikim krvnim žilama, kao što je aorta, a znatnije u manjim otporničkim arterijama i krvnim žilama (179-181).

Naša prethodna istraživanja pokazuju važnost cirkulirajućega ANG II i posljedične aktivacije receptora AT1 u održavanju normalnoga dilatacijskog odgovora krvožilja i otporničkih arterija normotenzivnih štakora (136,160,182,183) te Dahl na sol osjetljivih štakora, koji pokazuju kompromitiranu krvožilnu relaksaciju čak i kada su normotenzivni i hranjeni prehranom s niskim udjelom soli (184). Tretman normotenzivnih štakora losartanom, inhibitorom receptora AT1, značajno mijenja odgovor izoliranih otporničkih arterija skeletnoga mišićja na smanjen PO_2 , vjerojatno uslijed promjena u otpuštanju TXA_2 , konstriktornoga medijatora ovisnoga o ciklooksigenazi, te PGI_2 , vazodilatacijskoga čimbenika podrijetlom iz endotela. Međutim, u istim krvnim žilama nije došlo do promjene u dilataciji inducirane acetilkolinom (159). U drugom istraživanju, Phillips i suradnici pokazali su značajno promijenjenu vazodilataciju induciranu acetilkolinom, dok je dilatacija na hipoksiju održana u srednjim arterijama mozga u štakora na dugotrajnom tretmanu losartanom (185). Rezultati tih istraživanja pokazuju važnost normalnoga djelovanja RAS-a i toničke aktivacije receptora AT1 posredovane ANGII u održavanju normalnoga odgovora na vazodilatacijske podražaje u skeletnim, a i u krvnim žilama mozga. Nadalje, ti rezultati pružaju dokaz kako bi aktivacija receptora AT1 mogla imati presudnu ulogu u normalnom stvaranju metabolita arahidonske kiseline ovisnih o ciklooksigenazi, uključenih u normalni krvožilni odgovor na različite podražaje.

Budući da neka istraživanja pokazuju kako dugotrajna inhibicija RAS-a poboljšava funkciju endotela u hipertenzivnih pacijenata (186,187) te kako je ANGII ključni regulator

signalizacijskih mehanizama važnih za perifernu krvožilnu funkciju, uloga receptora AT1 od ključne je važnosti u održavanju normalne krvožilne funkcije (136,182).

Ukratko rečeno, dok je fokus najvećega broja istraživanja bio usmjeren na utjecaj moduliranja količine soli u svakodnevnoj prehrani na vrijednosti krvnoga tlaka i dok su se pojedinci djelili na „sol-osjetljive“ i „sol-rezistentne“ ovisno o navedenom učinku, sve je veći broj dokaza da posebice visok unos soli u organizam ima značajno djelovanje na krvožilni sustav koje je neovisno o promjenama krvnoga tlaka. Zbog toga postoji sve veći interes da se tu aktualnu temu – fiziološku, patofiziološku, pa čak i kliničku internističku, promotri iz potpuno novoga kuta. Naime, rezultati istraživanja koja su ispitivala učinak akutnoga povećanog unosa soli na endotelnu funkciju i krvnožilnu reaktivnost kod mladih zdravih pojedinaca još su oskudni i nedosljedni. Drugi problem je taj što je najveći broj tih istraživanja proučavao promjene u konduktivnim i otporničkim arterijama. Ipak, ako se uzme u obzir činjenica da se najranije promjene i oštećenja u raznim patološkim stanjima događaju upravo u mikrocirkulaciji, tada važan klinički podatak u praćenju i procjenjivanju nekoga patološkog učinka na krvožilni sustav treba biti upravo stanje mikrocirkulacije. I naravno, treći problem vezan uz tu problematiku jest da se jako malo zna o mehanizmima kojima visok unos soli djeluje na krvožilni sustav te da zapravo gotovo sve znanje o potencijalnim mehanizmima i putovima djelovanja temeljimo na rezultatima studija na animalnom modelu.

2. HIPOTEZA

Glavna je hipoteza ove studije da supresija reninsko angiotenzinskoga sustava povećanim unosom soli hranom tijekom sedam dana pogoršava vaskularnu reaktivnost u mikrocirkulaciji kože zdravih, mladih žena, neovisno o promjenama krvnoga tlaka, a posredovano vazokostriksijskim metabolitom arahidonske kiseline, tromboksanom A_2 (TXA₂).

3. CILJEVI

Glavni je cilj ovoga istraživanja bio odrediti utjecaj sedmodnevne dijeta s visokim udjelom soli na vaskularnu reaktivnost i endotelnu funkciju u mikrocirkulaciji kože u populaciji zdravih mladih žena te nastojati rasvijetliti barem dio mehanizama kojima promjena koncentracije soli u svakodnevnoj prehrani djeluje na vaskularnu funkciju.

Specifični su ciljevi ove studije sljedeći:

- 1) Utvrditi utjecaj visokoga ili niskoga unosa soli na vrijednosti krvnoga tlaka kod zdravih ispitanica
- 2) Utvrditi utjecaj visokoga ili niskoga unosa soli na promjene vaskularne reaktivnost u mikrocirkulaciji kože zdravih mladih žena
- 3) Izmjeriti serumske koncentracije topljivih adhezijskih molekula (sCAMs) ICAM-1, VCAM-1, E-selektina te endokana kod ispitanica na visokoj i niskoj slanoj dijeti
- 4) Izmjeriti plazmatsku koncentraciju metabolita arahidonske kiseline vazokonstriktora TXA₂ u krvi osoba na visokoj i niskoj slanoj dijeti
- 5) Odrediti ulogu izoformi COX-1 i COX-2 u promjeni mikrocirkulacijskoga protoka u koži pomoću neselektivnoga inhibitora COX-1 i COX-2 intometacina ili selektivnoga inhibitora COX-2 celekoksiba
- 6) Odrediti ulogu angiotenzinskih receptora AT₁ u održavanju mikrocirkulacijskoga protoka krvi sa selektivnom blokadom receptora AT₁ losartanom kod ispitanica na niskoslanjoj dijeti.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Populacija ispitanika

U istraživanju su sudjelovale zdrave mlade studentice medicine regrutirane preko oglasa na Medicinskom fakultetu Osijek. Kriteriji za izuzimanje ispitanika iz studije bile su od ranije znane bolesti, poput hipertenzije, koronarnih bolesti, šećerne bolesti, hiperlipidemije, oštećenja bubrega te cerebrovaskularne bolesti te bolesti perifernih krvnih žila. Nijedna od ispitanica nije uzimala lijekove koji bi mogli utjecati na njihov kardiovaskularni sustav. Svaka je ispitanica bila obavještena o ispitivanju te je potpisala informirani pristanak. Protokol i postupak istraživanja zadovoljili su standarde najnovijega izdanja Helsinške deklaracije, a bili su odobreni od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.2. Protokol istraživanja

To je bilo randomizirano, jednostrano prikriveno, placebo kontrolirano istraživanje. Sve ispitanice tijekom istraživanja održavale su dijetu s niskim udjelom natrija, s unosom natrija od 40 mmol Na na dan (DASH diet, U.S. Department of Health and Human Services, 2006) tijekom sedam dana. Osamnaest sudionica HSD skupine održavalo je dijetu s visokim udjelom soli (dnevni unos 200 mmol soli) tijekom sedam dana. Nadomjestak soli dan je ujutro i navečer u obliku jedne tablete natrijeva klorida koja je sadržavala 100 mmol narija. LSD skupinu činile su 24 ispitanice kojima je dan placebo. Deset ispitanica koje čine LSD+losartan skupinu uzimale su 50 mg losartana (selektivni inhibitor receptora AT1) dnevno tijekom sedmodnevnoga niskoslanog protokola.

Uzorak venske krvi uzet je prije i poslije izvođenja protokola nakon 30 minuta odmora u ležećem položaju. Prije i nakon izvođenja protokola prikupljen je 24-satni uzorak urina. Tijekom skupljanja uzorka urina ispitanice su slijedile standardni postupak u kojem su urin počele prikupljati nakon prvoga mokrenja, a nastavile do prvoga mokrenja sljedećega jutra.

Krvni tlak i broj otkucaja srca mjereni su na početku svakoga posjeta nakon 15 minuta odmora u sjedećem položaju pomoću poliautomatskoga tlakomjera (OMRON).

Konačne vrijednosti arterijskoga krvnog tlaka i otkucaja srca predstavljale su srednju vrijednost triju ponovljenih mjerenja.

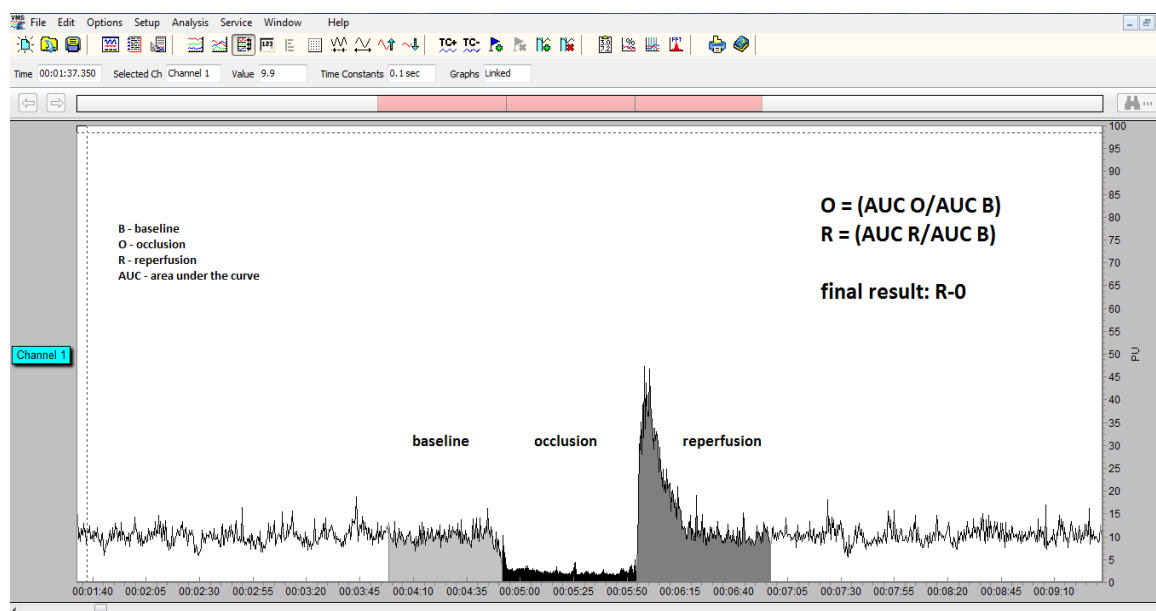
Visina i težina svake ispitanice izmjerena je prilikom svakoga posjeta kako bi se odredio indeks tjelesne mase (ITM) te opseg bokova i struka da bi se odredio omjer struk – bokovi (engl. Waist to Hip Ratio, WHR).

4.3. Određivanje protoka u mikrocirkulaciji kože

Mikrocirkulacijski protok mjereno je neinvazivnom metodom LDF (MoorVMS-LDF, Axminster, UK). Mjerene su promjene u protoku tijekom reaktivne hiperemije koja je uslijedila nakon okluzije protoka krvi. Brojna istraživanja pokazuju da promjene staničnoga oblika, tlaka, rastezljivosti te izazivanje žilnoga stresa (engl. shear stress) kao posljedice okluzije potiču mehanizme mehaničke signalizacije u stijenci arterija, što izaziva reaktivnu dilataciju koja predstavlja reaktivnu hiperemiju. Prethodno opisani metabolički čimbenici, mehanizmi mehaničke signalizacije, aktivacija glatkomišićnih i endotelnih receptora osjetljivih na rastezanje i endotelna sinteza NO-a, vjerojatno značajno pridonose razvoju reaktivne hiperemije (24-27). Reaktivna je hiperemija složen krvožilni odgovor na kratkotrajnu ishemiju, u kojemu endotel i njegov odgovor na različite konstriktorske ili dilatatorske čimbenike endotelnog podrijetla imaju značajnu ulogu (25). Mjerenje krvnoga protoka započelo je nakon 30 minuta aklimatizacije ispitanica u prostoru u kojem će se provesti mjerenje kako bi se izbjegli promjene u protoku krvi uzrokovane promjenama temperature. Tijekom mjerenja ispitanice su mirovale u ležećem položaju. Budući da je LDF mjerenje izrazito osjetljivo na pokrete ispitanice, a i pomicanje same sonde te provodnika koji povezuje sondu i LDF uređaj, mirujući položaj ispitanica postignut je potpurnim okvirom koji je udobno stabilizirao ruku ispitanice.

Sonda lasera pričvršćena je na volarnu stranu podlaktice na mjesto udaljeno od ručnoga zgloba 13-15 cm pomoću obostrano ljepljivih diskova, nabavljenih od istoga proizvođača. Nakon 5 minuta bazalnoga mjerenja, okluzija krvne žile izazvana je napuhavanjem pneumatske manžete postavljene na nadlakticu na 30-50 mmHg iznad vrijednosti sistoličkoga tlaka. Mjerenja su učinjena prije, tijekom i nakon otpuštanja jednogminutne okluzije. Promjene u protoku krvi izražene su arbitrarnim perfuzijskim jedinicama (PU). Za određivanje relativne promjene krvnoga protoka tijekom reaktivne hiperemije izazvane okluzijom, podaci su izraženi kao površina ispod krivulje (AUC)

tijekom bazalnoga protoka, okluzije i reperfuzije. Rezultati su prikazani kao razlika postotaka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na bazalne vrijednosti (slika 2.). Sva mjerenja protoka krvi izvršio je obučeni istraživač koji nije bio upućen u raspodjelu ispitanika po skupinama.



B – bazalni protok (engl. baseline), O – okluzija (engl. occlusion), R – reperfuzija (engl. reperfusion),
AUC – površina ispod krivulje (engl. area under the curve)

Slika 2. Mjerenje protoka u mikrocirkulaciji kože metodom LDF.

Promjene u protoku mikrocirkulacije izražene su arbitrarnim perfuzijskim jedinicama (PU, engl. perfusion units). Protok u mikrocirkulaciji u određenom vremenu određuje program računajući površinu ispod krivulje (AUC, engl. Area Under the Curve) tijekom bazalnoga protoka, okluzije i reperfuzije (AUC je obilježen zasjenjenim dijelovima). Budući da protok ne dostiže nultu vrijednost, čak i kada je perfuzija odsutna, vrijednosti protoka izražene su u obliku postotka u odnosu na neki određeni uspoređivač (u ovom slučaju bazalni protok). Odredili smo postotak protoka tijekom okluzije i reperfuzije u odnosu na bazalni protok. Konačan rezultat izražen je kao razlika postotka promjene protoka tijekom okluzije i reperfuzije u odnosu na bazalni protok (R-O). (Izvor: zapis originalnoga mjerenja, Laboratorij za fiziologiju mikrocirkulacije, Katedra za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek.)

4.4. Definiranje učinka ciklooksigenaznih enzima (COX-1, -2) u promjeni mikrovaskularne reaktivnostinakon dijete s visokim udjelom soli

Kako bismo istražili ulogu ciklooksigenaznih enzima (COX-1 i COX-2) u regulaciji tkivnoga protoka krvi nakon dijete s visokim udjelom soli, 13 sudionika iz HSD skupine primilo je 100 mg indometacina (neselektivnoga inhibitora COX-1 i COX-2) 90 minuta (20) prije ponovnoga LDF mjerenja prije i nakon odgovarajućega dijetnog protokola, dok je 10 sudionika iz HSD skupine primilo 200 mg celekoksiba (selektivnoga inhibitora COX-2) 180 minuta prije ponovnoga LDF mjerenja prije i nakon odgovarajućeg dijetnog protokola.

4.5. Biokemijska mjerenja

U uzorku krvi izmjereni su elektroliti plazme (natrij i kalij), plazmatska razina ureje te plazmatska razina kreatinina. U 24-satnom urinu izmjerene su vrijednosti natrija, kalija, ureje i kreatinina, a razina albumina određena je na Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Osijek. Plazmatska aktivnost renina (PRA) i plazmatska koncentracija aldosterona izmjerene su na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja Kliničkoga bolničkog centra Osijek, primjenjujući standardnu metodu radioimunotesta.

4.6. Mjerenje plazmatske koncentracije tromboksana A2 - vazokonstriktornoga čimbenika ovisnoga o ciklooksigenazi

Budući da tromboksan A2 u fiziološkim uvjetima ima poluvrijeme života svega 37 sekundi, stvaranje tromboksana A2 u živom organizmu prati se mjerenjem TXB2 i 2,3-dinor TXB2. Tromboksan B2 (TXB2) nastaje neenzimskom hidracijom tromboksana A2 i pokazao se kao stabilan metabolit (28). Plazmatska koncentracija stabilnoga metabolita TXA2, TXB2 određena je pomoću seta za imunoenzimsko ispitivanje dostupnoga na

tržištu (11-dehydro-TXB2 ELISA Kit, ABNOVA Corporation, Taiwan) u Laboratoriju za fiziologiju mikrocirkulacije na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.7. Mjerenje koncentracija serumskih topljivih adhezijskih molekula (sCAMs)

ICAM-1, VCAM-1, E-selektina i endokana

Serumske koncentracije topljivih međustaničnih adhezijskih molekula (sICAM-1), topljivih adhezijskih molekula krvožilnih stanica (sVCAM-1) i sE-selektina, koje su biljezi aktivacije endotela, određene su pomoću ELISA seta dostupnoga na tržištu (Anti-Human CD54 ICAM-1; Anti-Human CD106 VCAM-1; Anti-Human CD62E E-selectin; eBioscience, USA) dok je plazmatska koncentracija endokana određena pomoću ESM1 ELISA seta (Endothelial Cell Specific Molecule 1 ESM1, USCN Life Sciences Inc.) u Laboratoriju za fiziologiju mikrocirkulacije na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek.

4.8. Statistička analiza

Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Kliničke karakteristike prije i nakon održanoga protokola uspoređene su pomoću t-testa za zavisne uzorke (engl. paired t-test). Kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenjen je Wilcoxonov test sume rangova (engl. Wilcoxon rank-sum test). Studentov t-test (engl. student t-test) je korišten za usporedbu parametara između eksperimentalnih protokola. Kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenjen je Mann-Whitneyev U-test (engl. Mann-Whitney Rank Sum Test). Statistička značajnost podešena je na $P < 0.05$. Kako bi se postigla 80% snaga te razina značajnosti $P < 0.05$, rabili smo analizu veličine uzorka pomoću t-testa za zavisne uzorke. Ta analiza pokazala je da je potreban uzorak od 10 ispitanica kako bi istraživanje bilo valjano. Za statističku analizu uporabljen je SigmaPlot (version 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA).

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

U istraživanju su sudjelovale šezdeset i četiri zdrave mlade ispitanice (prosječna dob 20 ± 2 godine). Indeks tjelesne mase iznosio je 22.4 ± 3 kg/m², dok je omjer struk/bokovi bio 0.73 ± 0.04 . Tjelesna masa ispitanica nije se promijenila po završetku istraživanja u usporedbi s kontrolnim vrijednostima. Tablica 1. prikazuje hemodinamičke podatke populacije koja je sudjelovala u istraživanju. Srednja vrijednost triju mjerenja krvnoga tlaka potvrdila je da su ispitanice bile normotenzivne prije provođenja protokola. Sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak nisu se značajnije promijenili nakon HSD protokola, ali su se značajno snizili nakon LSD protokola. Također nije bilo promjena arterijskoga krvnog tlaka u ispitanica koje su bile u LSD+losartan skupini. Puls se značajno snizio nakon HSD protokola, dok se nakon LSD protokola i LSD+losartan protokola nije mijenjao.

Tablica 1. Hemodinamički parametri ispitanika

Varijabla	prije HSD	poslije HSD	prije LSD	poslije LSD	prije LSD+losartan	poslije LSD+losartan
SBP	105±9	105±10	105±10	100±9*	103±7	100±6
DBP	71±8	71±7	69±9	66±7*	67±6	66±6
MAP	82±8	82±8	81±9	77±7*	79±6	77±5
HR	76±10	71±9*	74±13	74±14	82±12	81±15

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD

SBP - sistolički arterijski tlak, DBP - dijastolički arterijski tlak

MAP - srednji arterijski tlak, HR - puls

* $P < 0.05$ prije vs. poslije HSD protokola (n=30) ili

prije vs. poslije LSD protokola (n=24)

5.2. Biokemijski parametri

Tablica 2. prikazuje promjene biokemijskih parametara mjerenih u uzorku venske krvi te 24-satnom uzorku urina mladih zdravih žena koje su sudjelovale u ovom istraživanju.

Razina natrija u plazmi porasla je tijekom HSD protokola. Razina kreatinina u plazmi je porasla nakon LSD protokola, a plazmatska razina ureje snizila se nakon LSD+losartan dijetnoga protokola u usporedbi s kontrolnim vrijednostima izmjerenima prije provedbe protokola. Drugih značajnih promjena bazalnih vrijednosti plazmatskih elektrolita (kalij) ili koncentracije ureje i kreatinina prije i nakon HSD, LSD, kao ni nakon LSD+losartan protokola nije bilo.

Kao što je očekivano, razina aldosterona u plazmi porasla je nakon LSD protokola, a snizila se nakon HSD protokola. Plazmatska aktivnost renina snizila se nakon HSD, a porasla nakon LSD protokola. Plazmatska aktivnost renina, a i razina aldosterona u plazmi značajno su porasle i nakon sedmodnevnoga LSD+losartan protokola u usporedbi s kontrolnim vrijednostima izmjerenima prije provođenja protokola.

Ekskrecija natrija u urinu značajno je porasla nakon HSD protokola, a očekivano pala nakon LSD i LSD+losartan protokola. Nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji ureje i kreatinina u 24-satnom uzorku urina prije, a ni nakon oba HSD i LSD protokola, dok se ekskrecija ureje u urinu značajno smanjila nakon LSD+losartan dijetnoga protokola. Koncentracija albumina u 24-satnom uzorku urina smanjila se nakon LSD i LSD+losartan protokola dok je ostala nepromijenjena nakon HS protokola.

Nije pronađena značajna razlika među biokemijskim parametrima između LSD i LSD+losartan skupine nakon provedenoga sedmodnevnog protokola.

Tablica 2. Biokemijski parametri ispitanika

Varijabla	prije HSD	poslije HSD	prije LSD	poslije LSD	prije LSD+losartan	poslije LSD+losartan
volumen 24h urina mL	1221±796	1389±980	1146±593	1327±580	1338±414	1280±361
Na u 24h urinu mmol/dU	126.8±45.2	232.0±91.4*	118.7±56	82.6±43.1*	160±65	75±43*
K u 24h urinu mmol/dU	43.8±13.8	43.8±15.5	42.8±16.3	39.8±16.7	40±11	34±10
urea u 24h urinu mmol/dU	10191±2663	9675±2871	10076±2922	9713±3443	236±86	175±75*
kreatinin u 24h urinu μmol/dU	220±58	224±87	219±77	196±67	10871±2035	9879±3328
albumin u 24h urinu /dU	4.6±2.4	5.0±3.7	8.4±8.1	5.6±6.3*	6±2	3±1*
Na u plazmi mmol/L	137±1*	138±1	137±2	137±2	137±2	136±2
K u serumu mmol/L	4.6±1.1	4.4±0.5	4.7±1.6	4.3±0.4	4.1±0.5	4±0.4
urea u serumu mmol/L	4.1±0.8	3.9±0.9	3.9±1.2	3.8±1.1	4.1±1	3.6±0.6*
kreatinin u serumu μmol/L	66±9	64±8	63±9	68±10*	64±6	66±8
PRA ng/mL/h	1.43±1.63	0.87±0.86*	1.23±1.53	1.99±1.7*	0.7±0.5	4.1±1.5*
aldosteron u plazmi pmol/L	849±462	553±394*	668±418	1176±816*	434±186	733±297*

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD

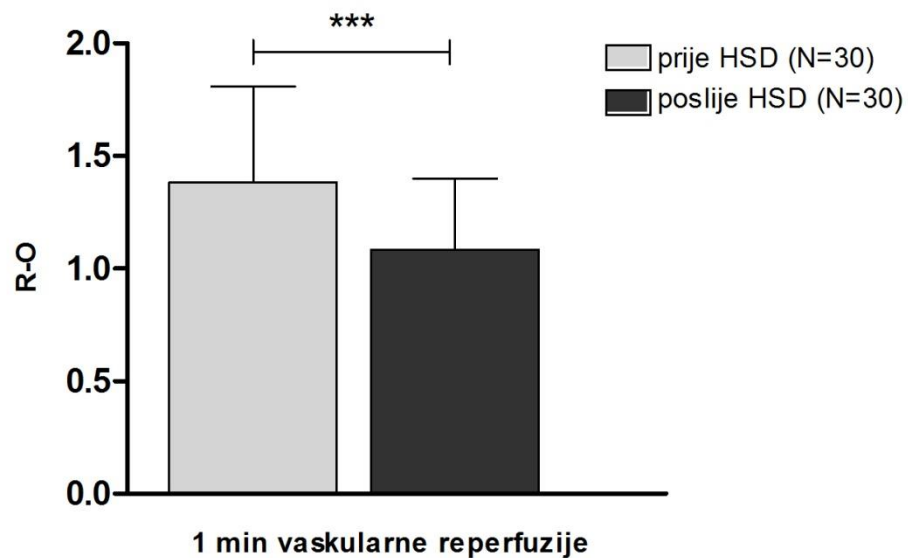
PRA - plazmatska reninska aktivnost

* P<0.05 prije vs. poslije HSD protokola (n=30), prije vs. poslije LSD protokola (n=24) ili prije vs. poslije LSD+losartan protokola (n=10)

5.3. Utjecaj dijeta s visokim i niskim udjelom soli na protok krvi u mikrocirkulaciji kože mjereno tehnikom laser Doppler

Slika 3. prikazuje značajno pogoršanje hiperemičnoga protoka krvi nakon jednogminutne okluzije u skupini koja je bila sedam dana na HSD protokolu, u usporedbi s

kontrolnim vrijednostima hiperemičnoga protoka krvi mjerenima prije dijetnoga protokola (delta R-O prije HSD 1.4 ± 0.4 vs. poslije HSD 1.1 ± 0.3 , $P < 0.001$).



*** $P < 0.001$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD

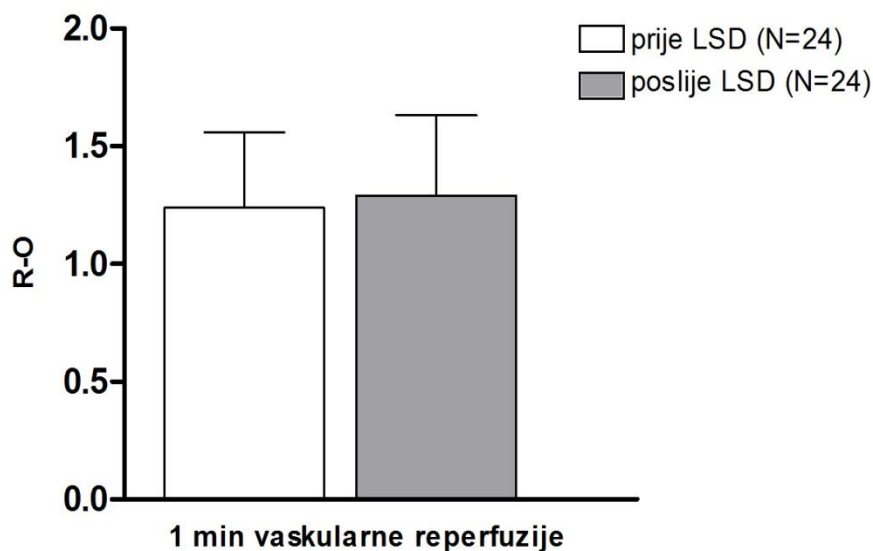
HSD - dijeta s visokim udjelom soli

R-O - razlika postotka promjene protoka između okluzije i reperfuzije
(u odnosu na bazalni protok)

Slika 3. Utjecaj sedmodnevne dijetete s visokim udjelom soli (HSD) na postokluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože.

Sedam dana HSD protokola dovelo je do značajnoga pogoršanja postokluzivne reaktivne hiperemije u mikrocirkulaciji kože.

Slika 4. prikazuje kako se hiperemični protok krvi nije značajno mijenjao u ispitanica na LSD protokolu u usporedbi s kontrolnim vrijednostima izmjerenima prije provođenja protokola (delta R-O prije LSD 1.2 ± 0.3 vs. poslije LSD protokola 1.3 ± 0.3 , $P = 0.562$).



Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD
 LSD - dijeta s niskim udjelom soli
 R-O - razlika postotka promjene protoka između okluzije i reperfuzije
 (u odnosu na bazalni protok)

Slika 4. Utjecaj sedmonevne dijeta s niskim udjelom soli (LSD) na postokluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože.

Sedam dana LSD protokola nije dovelo do značajnih promjena postokluzivne reaktivne hiperemije u mikrocirkulaciji kože.

5.4. Mjerenje koncentracija topljivih adhezivnih staničnih molekula (sCAMs): ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina te koncentracije endokana u serumu nakon dijeta s visokim i niskim udjelom soli

Koncentracija topljivih staničnih adhezivnih molekula u serumu nije se značajnije mijenjala nakon HSD i LSD protokola u usporedbi s vrijednostima mjerenim prije oba dijetna protokola. S druge strane, koncentracija endokana u serumu značajno se smanjila

nakon HSD protokola, dok se nije značajnije mijenjala poslije LSD protokola, u usporedbi s vrijednostima mjerenima prije oba dijetna protokola (tablica 3.).

Tablica 3. Solubilne stanične adhezijske molekule (sCAMs) i endokan

Variijabla	prije HSD	poslije HSD	prije LSD	poslije LSD
sICAM-1 (ng/mL)	235.59±60.66	224.71±65.05	255.42±108.29	256.84±99.7
sVCAM-1 (ng/mL)	2511±2880	2385±4427	2429±2300	2071±2582
sE-selektin (ng/mL)	38.45±26.79	53.31±63.35	37.62±21.91	57.99±41.17
endokan (ng/mL)	107.38±0.04	107.33±0.06*	107.4±0.15	107.35±0.07

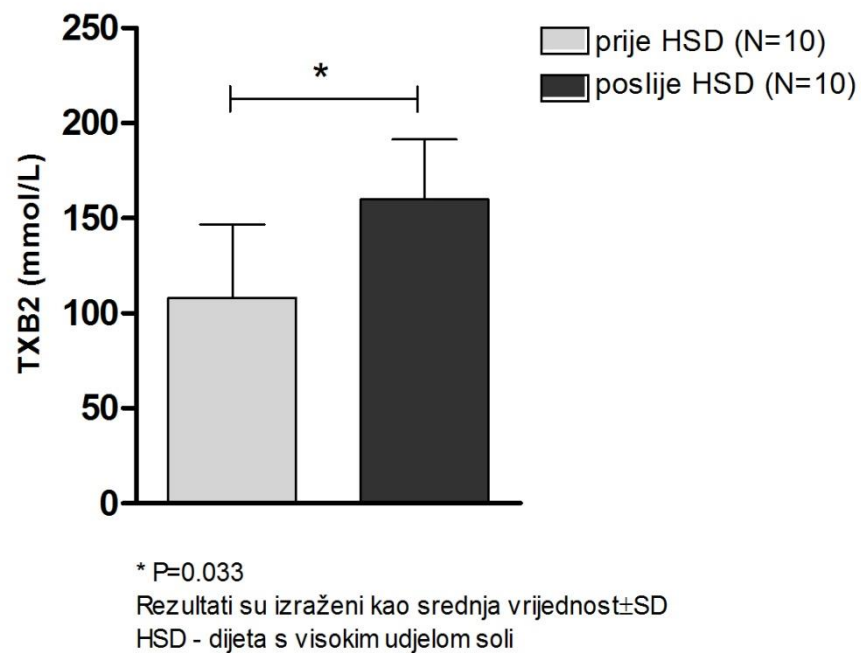
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD

* P<0.05 prije HSD vs. poslije HSD protokola (n=30) ili

prije LSD vs. poslije LSD protokola (n=24)

5.5. Utjecaj dijetne s visokim i niskim udjelom soli na plazmatsku koncentraciju TXB₂

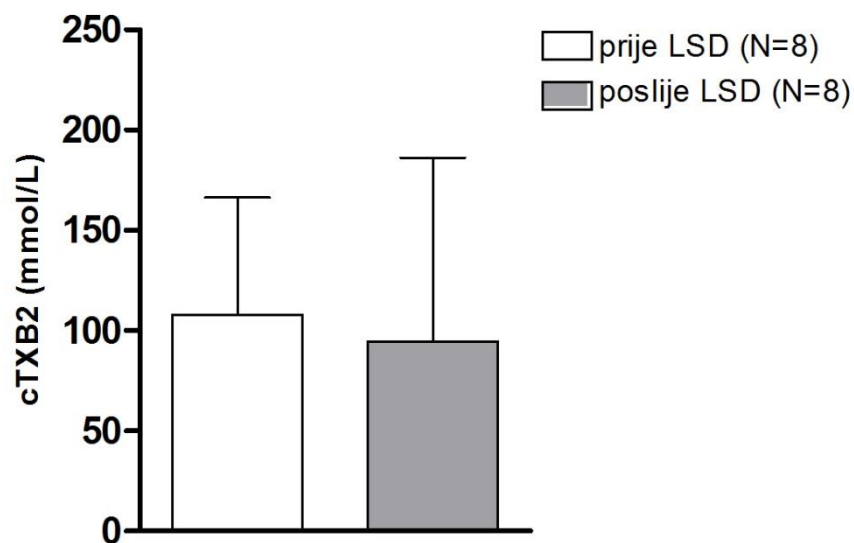
Plazmatska koncentracija TXB₂ značajno je porasla nakon jednoga tjedna dijetne s visokim udjelom soli u usporedbi s kontrolnim vrijednostima prije provođenja protokola (kontrolna cTXB₂ pg/mL prije HSD 108±39 vs. poslije HSD protokola 160±31, P=0.033) (slika 5.).



Slika 5. Utjecaj sedmodnevne dijeta s visokim udjelom soli (HSD) na koncentraciju TXB2 u plazmi.

Koncentracija TXB2 u plazmi značajno je porasla nakon sedam dana HSD protokola u usporedbi s kontrolnim vrijednostima prije dijetnog protokola.

Tjedan dana dijeta s niskim udjelom soli nije imao značajan utjecaj na plazmatsku koncentraciju TXB2 u usporedbi s kontrolnim vrijednostima prije provođenja dijetnoga protokola (cTXB₂ pg/mL prije LSD 108±58 vs. poslije LSD protokola 95±92, P=0.713) (slika 6.).



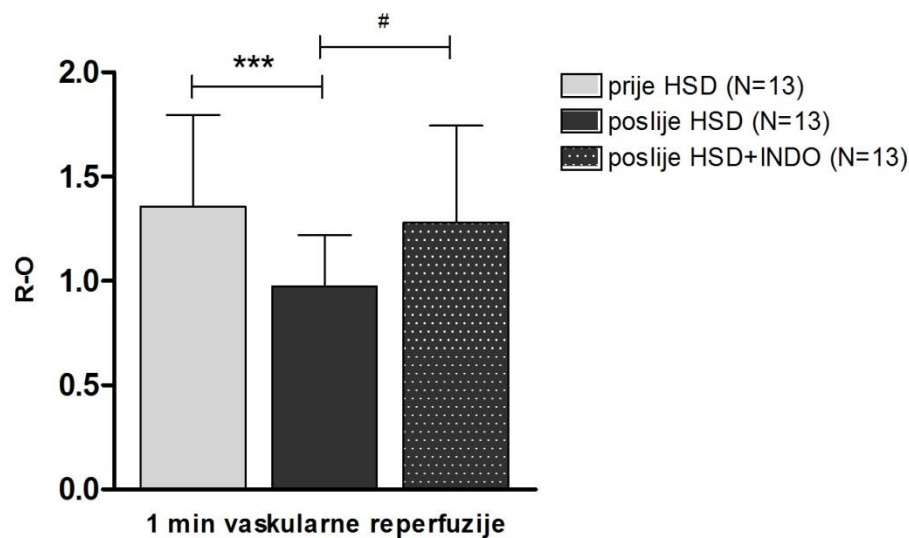
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD
HSD - dijeta s visokim udjelom soli

Slika 6. Utjecaj sedmodnevne dijeta s niskim udjelom soli (LSD) na koncentraciju TXB2 u plazmi.

Koncentracija TXB2 u plazmi nije se značajno mijenjala nakon sedam dana LSD protokola u usporedbi s kontrolnim vrijednostima prije dijetnoga protokola.

5.6. Učinak indometacina, neselektivnoga inhibitora ciklooksigenaznih enzima (COX-1 i COX-2), i celekoksiba, selektivnoga COX-2 inhibitora, na protok krvi u mikrocirkulaciji kože

Slika 7. pokazuje kako je administracija indometacina dovela do oporavka smanjenjenoga hiperemičnog protoka krvi nakon jednogminutne okluzije, koji je nastao kao posljedica sedmodnevnoga HSD protokola (delta R-O HSD 1.0 ± 0.2 vs. HSD+INDO protokola 1.3 ± 0.5 , $P=0.05$), u usporedbi s hiperemičnim protokom krvi nakon jednogminutne okluzije prije primjene same administracije indometacina.



*** $P < 0.001$ (prije HSD vs. poslije HSD)

$P = 0.05$ (poslije HSD vs. poslije HSD+INDO)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD

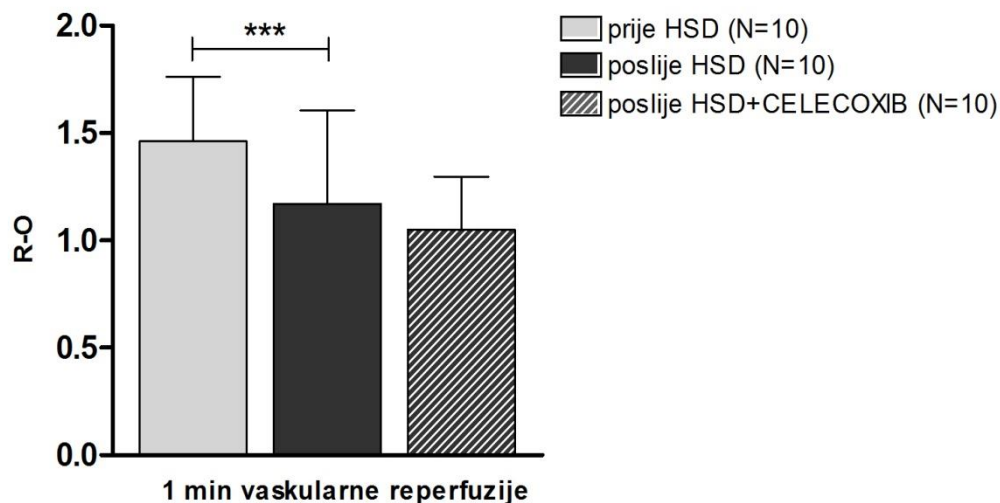
HSD - dijeta s visokim udjelom soli, INDO - indometacin

R-O - razlika postotka promjene protoka između okluzije i reperfuzije
(u odnosu na bazalni protok)

Slika 7. Relativna promjena protoka u mikrocirkulaciji kože između vaskularne reperfuzije i okluzije (R-O) prije i poslije HSD protokola bez administracije indometacina i s njom.

Administracija indometacina dovela je do oporavka smanjenjenoga hiperemičnog protoka krvi nakon jednogminutne okluzije, koji je nastao kao posljedica sedmodnevne dijeta s visokim udjelom soli.

Administracija celekoksiba nije uzrokovala značajnije promjene u hiperemičnom protoku krvi koji je uslijedio nakon jednogminutne okluzije kod HS skupine (delta R-O HSD 1.1 ± 0.4 vs. HSD+celekoksib protokola 1.1 ± 0.3 , $P = 0.296$) u odnosu na hiperemični protok krvi nakon jednogminutne okluzije prije same primjene celekoksiba (slika8.).



*** $P < 0.001$ (prije HSD vs. poslije HSD)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD

HSD - dijeta s visokim udjelom soli

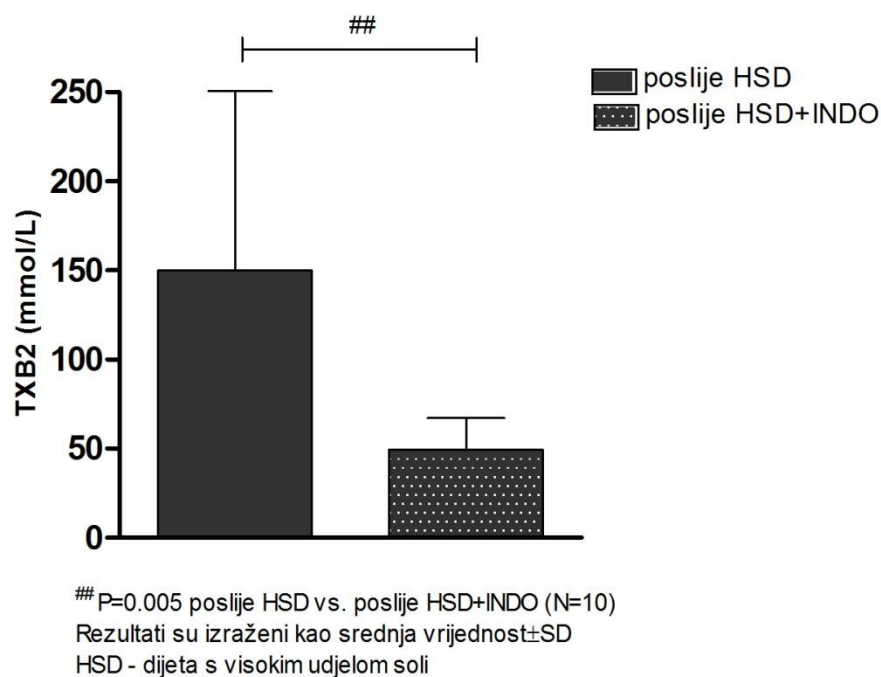
R-O - razlika postotka promjene protoka između okluzije i reperfuzije
(u odnosu na bazalni protok)

Slika 8. Relativna promjena protoka u mikrocirkulaciji kože između vaskularne reperfuzije i okluzije (R-O) prije i poslije HSD protokola bez administracije celekoksiba i s njom.

Administracija celekoksiba nije imala značajnoga utjecaja na smanjenje hiperemičnog protoka krvi nakon jednog minute okluzije, koji je nastao kao posljedica sedmodnevne dijeta s visokim udjelom soli.

5.7. Učinak indometacina, neselektivnoga inhibitora ciklooksigenaznih enzima (COX-1 i COX-2), i celekoksiba, selektivnog COX-2 inhibitora, na plazmatsku koncentraciju TXB2 nakon dijeta s visokim udjelom soli

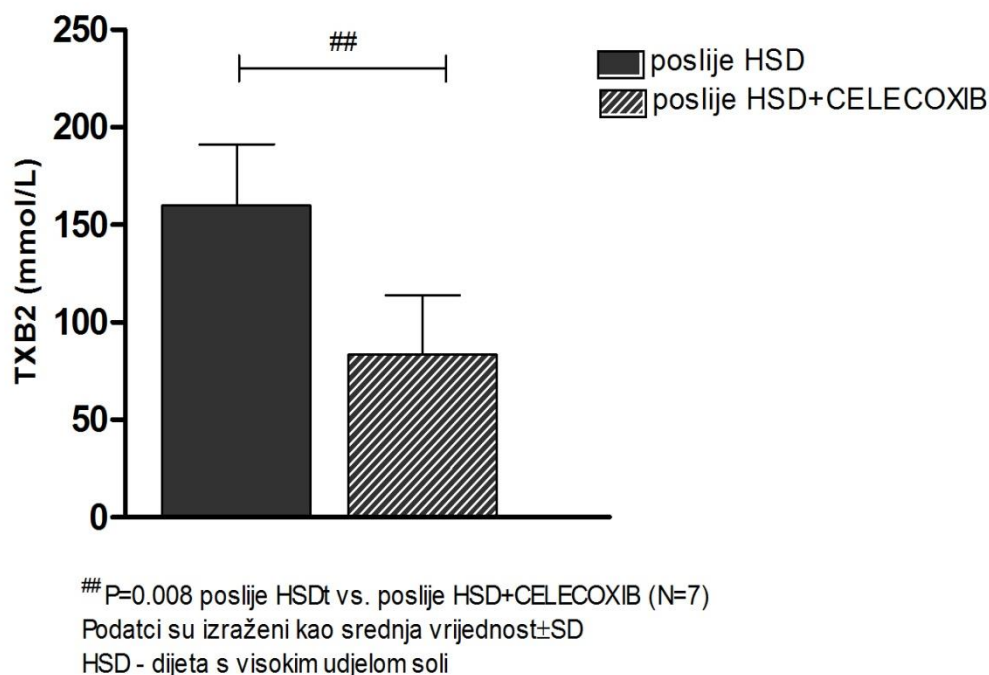
Primjena indometacina značajno je snizila razine TXB2 nakon HSD protokola u usporedbi s vrijednostima TXB2 mjerenima nakon HSD-a, a prije administracije indometacina (cTXB₂ pg/mL poslije HSD 150 \pm 100 vs. HSD+INDO protokola 50 \pm 18, $P=0.005$) (slika 9.).



Slika 9. Učinak indometacina na plazmatsku koncentraciju TXB2 poslije dijeta s visokim udjelom soli (HSD).

Administracija indometacina značajno je smanjila povećanu koncentraciju TXB2 u plazmi poslije HSD protokola.

Primjena celekoksiba značajno je snizila razine TXB2 nakon HSD protokola u usporedbi s vrijednostima TXB2 mjerjenima nakon HSD protokola, a prije administracije celekoksiba (cTXB₂ pg/mL poslije HSD 160±20 vs. HSD+celecoxib protokola 83±31, P=0.008) (slika 10.).



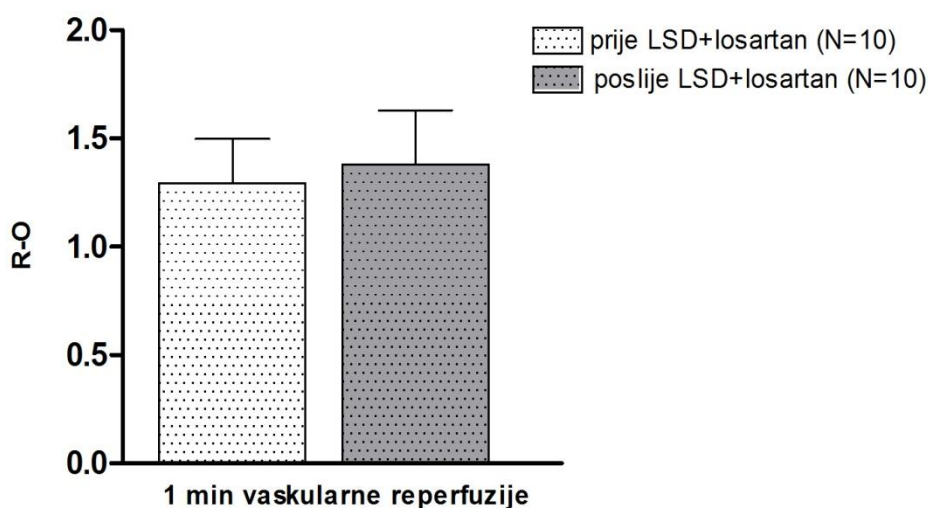
Slika 10. Učinak celekoksiba na plazmatsku koncentraciju TXB2 poslije dijeta s visokim udjelom soli (HSD).

Administracija celekoksiba značajno je smanjila povećanu koncentraciju TXB2 u plazmi poslije HSD protokola.

5.8. Učinak administracije losartana tijekom sedmodnevnog LSD protokola na krvni protok mikrocirkulacije kože

Kako je već navedeno, hiperemični protok krvi koji je uslijedio nakon jednogminutne okluzije mjeren LDF-om nije se značajno mijenjao nakon LSD dijetnog protokola u usporedbi s kontrolnim vrijednostima (delta R-O prije LSD 1.2 ± 0.3 vs. poslije LSD protokola 1.3 ± 0.3 , $P=0.562$). Slika 11 prikazuje učinak administracije losartana, antagonista receptora AT1, na reaktivnu hiperemiju kože u mladih zdravih žena koje su provodile LSD protokol. Sedmodnevna primjena losartana tijekom LSD protokola nije značajno promijenila reaktivnu hiperemiju kože koja je uslijedila nakon jednogminutne

krvožilne okluzije (delta R-O prije LSD+losartan 1.3 ± 0.2 vs. poslije LSD+losartan protokola 1.4 ± 0.2 , $P=0.734$).



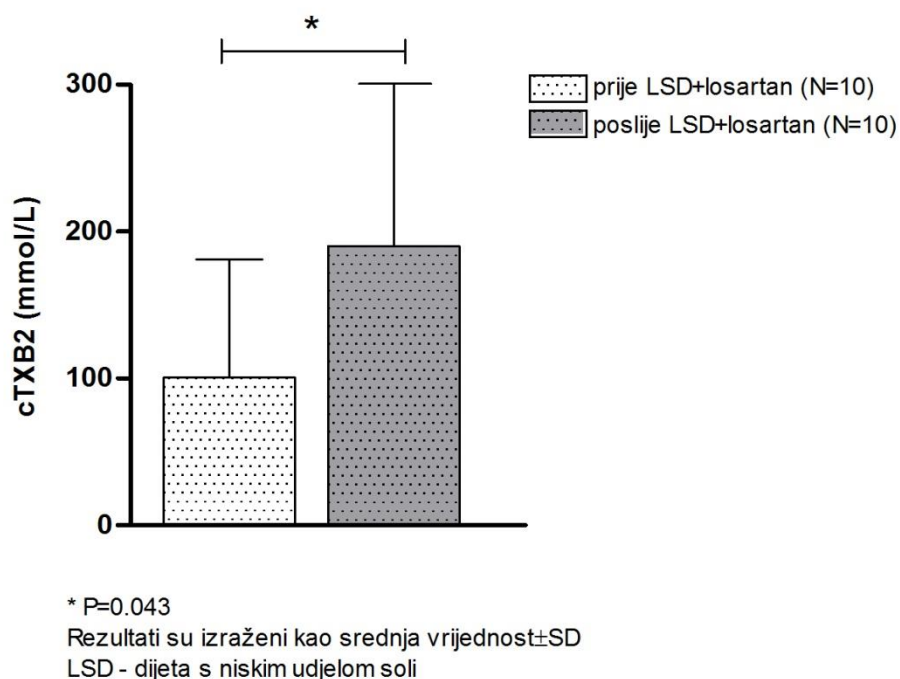
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD
R-O - razlika postotka promjene protoka između reperfuzije i okluzije
(u odnosu na bazalni protok)

Slika 11. Učinak administracije losartana tijekom sedmodnevnoga niskoslanog dijetnog protokola na postokluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože. Nije pronađena razlika u relativnoj promjeni protoka krvi između jednogminutne okluzije krvne žile i pripadajuće reperfuzije (R-O) prije i poslije sedmodnevnoga LSD protokola u svakodnevnu primjenu losartana.

5.9. Učinak administracije losartana tijekom sedamodnevnoga LSD protokola na plazmatsku koncentraciju TXB2

Slika 12. prikazuje učinak primjene losartana tijekom LSD protokola na plazmatsku koncentraciju tromboksana B2. Kako je već navedeno, tjedan dana LSD protokola značajno je utjecalo na plazmatske razine TXB2 u usporedbi s kontrolnim vrijednostima prije dijetnog protokola (cTXB₂ pg/mL prije LSD 108 ± 58 vs. poslije LSD protokola 95 ± 92 , $P=0.713$). Ipak, zabilježen je značajan porast plazmatske razine TXB2 nakon sedmodnevnoga LSD+losartan protokola u odnosu na vrijednosti izmjerene prije provedbe protokola (cTXB₂ pg/mL prije LSD+losartan 101 ± 80 vs. poslije LSD+losartan protokola 190 ± 116 , $P=0.043$). Nije pronađena značajna razlika u plazmatskim vrijednostima TXB2

između LSD i LSD+losartan skupine nakon što su provedena oba sedmodnevna protokola (cTXB₂ pg/mL poslije LSD 95±92 vs. poslije LSD+losartan 190±116, P=0.194).



Slika 12. Učinak sedmodnevnoga niskoslanog dijetnog protokola uz administraciju losartana na plazmatske razine TXB₂, vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazama.

Budući da tromboksan A₂ u fiziološkim uvjetima ima poluvrijeme života svega 37 sekundi, stvaranje tromboksana A₂ u živome organizmu prati se mjerenjem njegova stabilnoga metabolita TXB₂. Plazmatska razina TXB₂ značajno je porasla nakon jednoga tjedna LSD+losartan protokolau usporedbi s kontrolnim vrijednostima.

6. RASPRAVA

6.1. Uloga vazokonstriktornih prostaglandina u nastanku i razvoju mikrovaskularne disfunkcije izazvane dijetom s visokim udjelom soli

Glavna spoznaja ovoga dijela istraživanja jest da je jedan tjedan povećnoga unosa soli uzrokovao pogoršanje endotelne funkcije krvnih žila mikrocirkulacije kože, koji se manifestirao smanjenim postokluzivnim hiperemičnim odgovorom te porastom plazmatske koncentracije TXA₂, vazokonstriktornoga medijatora ciklooksigenaznoga podrijetla, kao i da je administracija indometacina nakon dijetete s visokim udjelom soli povratila hiperemični odgovor mikrocirkulacije kožena vrijednosti kakve su bile prije dijetnoga protokola.

Široko je prihvaćeno mišljenje da visok unos soli u svakodnevnoj prehrani jest esencijalni nezavisni rizični čimbenik u razvoju i napredovanju hipertenzije (4,152,157). Također, istraživanje DASH (koje je poslužilo kao izvor prehrambenoga plana s niskim unosom soli u ovom istraživanju) pokazalo je pozitivne učinke smanjenja unosa soli na vrijednosti sistemskog krvnog tlaka (151).

Ipak, mehanizmi kojima promjene količine soli u prehrani utječu na krvni tlak i krvnožilnu funkciju nisu dobro razumljivi. Sve je veći broj dokaza koji pokazuju da je endotelna disfunkcija rana manifestacija štetnoga učinka konzumacije velike količine soli (17-19). Stoga je svrha ovoga istraživanja bila istražiti pogoršava li kratkotrajno povećanje unosa soli u organizam protok krvi u mikrocirkulaciji oštećujući funkciju endotela te istražiti ulogu metabolita ciklooksigenaznoga podrijetla u regulaciji protoka krvi u mikrocirkulaciji u odgovoru na promjenu unosa soli u svakodnevnoj prehrani.

Ovo istraživanje je pritom pokazalo da jedan tjedan prehrane s visokim udjelom soli pogoršava postokluzivni hiperemični protok u mikrocirkulaciji kože koji se bio oporavio kod ispitanicana HSD protokolu nakon inhibicije ciklooksigenaznih enzima indometacinom, ali ne i celekoksibom (slika 7. i 8.). Jedan tjedan prehrane s visokim udjelom soli također je uzrokovao značajan porast plazmatske razine TXA₂, vazokonstriktora ciklooksigenaznoga podrijetla, čija je razina značajno smanjena nakon primjene celekoksiba. Jedan tjedan prehrane s niskim udjelom soli nije utjecao na postokluzivni hiperemični vaskularni odgovor u mikrocirkulaciji kože (slika 4.).

6.1.1. Dijetni protokol

Kao što je već navedeno u uvodu, prekomjerni unos soli velik je problem danas u gotovo svim dijelovima svijeta, primjerice prosječni unos soli kod muškaraca u Hrvatskoj jest 13.3 ± 4.3 g na dan (223.6 ± 74.0 mmol Na/24-satni urin), dok je kod žena 10.2 ± 4.2 g na dan (177.3 ± 69.1 mmol Na/24-satni urin) (3). 64 ispitanice koje su sudjelovale u ovom istraživanju prosječno su konzumirale 7.7 ± 3.1 g na dan soli prije provođenja prehrambenog protokola (što je određeno mjerenjem količine natrija u 24-satnom uzorku urina, 129.9 ± 51.6 mmol/dU), što je ispod prosjeka u Hrvatskoj. Unos soli u HSD skupini bio je 240 mmol na dan te veličina ekskrecije natrija u ovom istraživanju nije rijetkost u svakodnevnom životu brojnih pojedinaca. Snižene razine natrija u urinu kod ispitanica koje su provodile LSD protokol i povišene razine natrija u urinu kod ispitanica koje su provodile HSD protokol potvrđuju da su protokol provodile pravilno te da su se pridržavale danih uputa o prehrani. Plazmatska aktivnost renina i razina aldosterona također su se promijenile u očekivanom smjeru (povećali su se nakon LSD protokola, a smanjili se nakon HSD protokola), pružajući dodatnu potvrdu pridržavanja prehrambenih uputa određenih u ovome istraživanju (tablica 2.).

6.1.2. Krvni tlak

Mnoga epidemiološka i intervencijska istraživanja pokazala su jasnu povezanost između količine unosa soli u organizam i hipertenzije (188,189). Ipak, još uvijek nije točno određeno koliko treba trajati povišen unos soli koji bi mogao izazvati povišenje krvnoga tlaka u mladih zdravih pojedinaca. Tzemos i suradnici pokazali su da sedam dana pojačanoga unosa soli značajno povišuje razinu brahijalnoga sistoličkog tlaka kod mladih zdravih ispitanika (143). Nasuprot tome, Starmans-Kool i suradnici pokazali su da 14 dana prehrane s visokim udjelom soli izaziva minimalne promjene u brahijalnom krvnom tlaku, iako su iskazali snažnu povezanost između modifikacije soli u prehrani i karotidnoga krvnog tlaka (145). U našem istraživanju nije pronađena značajna razlika u brahijalnom sistoličkom, dijastoličkom, a ni srednjem arterijskom tlaku nakon jednoga tjedna prehrane s visokim udjelom soli. Međutim, pronađeno je značajno sniženje brahijalnoga sistoličkog, dijastoličkog i srednjeg arterijskog tlaka nakon sedmnodnevne prehrane s niskim udjelom soli (tablica 1.). Ti su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja koje je ispitalo utjecaj

DASH prehrane na krvni tlak kod normotenzivnih pojedinaca (151). Ipak, smanjeni krvni tlak u našoj LSD skupini nije siguran pokazatelj različite osjetljivosti na sol među pojedincima, budući da se odgovor sistoličkoga krvnoga tlaka na promjene u unosu soli u istraživanju DASH tijekom vremena pokazao nekonzistentnim i neponovljivim (150). Rezultati ove studije tako podržavaju trenutačne preporuke da smanjenje unosa soli ima pozitivan učinak u široj populaciji, više nego teoriju osjetljivih pojedinaca (150,152). U skladu s ovim zapažanjima, prije spomenuta istraživanja (143,145,150,152) nisu otkrila značajnije promjene u pulsu nakon jednog kao niti nakon dva tjedna prehrane s visokim udjelom soli (tablica 1.).

6.1.3. Ispitivanje protoka u mikrocirkulaciji kože pomoću laser Doppler metode

Mnoga istraživanja pokazala su da prehrana s visokim udjelom soli vodi k razvoju endotelne disfunkcije (17-19). Većina istraživanja koja su se bavila proučavanjem endotelne disfunkcije u ljudi bila su usredotočena na konduktivne i otporničke arterije kao zamjenu za krajnju točku koronarne bolesti, koronarne arterije (138,143,144). Međutim, prije no što se dogode prve promjene u vaskularnom sustavu i konačno oštećenje organa u raznim patološkim stanjima, važno je procijeniti promjene u protoku krvi, naročito u mikrocirkulaciji. Ovo istraživanje prvo je koje je usmjereno na utjecaj prehrane s visokim udjelom soli na regulaciju mikrocirkulacije u ljudi. Glavna prednost metode LDF jest sposobnost neinvazivne procjene protoka krvi u mikrocirkulaciji u stvarnom vremenu te dovoljna osjetljivost u detekciji relativnih promjena u protoku krvi u mikrocirkulaciji kože tijekom odgovora na dane stimuluse (112).

Rezultati prijašnjih istraživanja koja su ocjenjivala utjecaj prehrane s visokim udjelom soli na endotelnu disfunkciju u mladih zdravih pojedinaca pokazala su se nedosljednima. Tako su primjerice Tzemos i suradnici pokazali pogoršanu endotelnu funkciju nakon sedam dana visokoga unosa soli, što je procijenjeno na temelju mjerenja protoka krvi u podlaktici metodom venske okluzivne pletizmografije (143). Liu i suradnici prikazali su značajno sniženu dilataciju brahijalne arterije posredovanu protokom nakon jednog tjedna povećanoga unosa soli (144). Dickinson i suradnici izvijestili su o pogoršanoj postprandijalnoj endotelnoj funkciji koja je određena metodom mjerenja dilatacije brahijalne arterije posredovane protokom nakon samo jednoga obroka s visokim udjelom

solu kod mladih zdravih pojedinaca (146). Nasuprot tomu, Stein i suradnici nisu pronašli nikakav učinak povećanog unosa soli na vazodilataciju izazvanu metakolinom u skupini zdravih ispitanika (138). Nadalje, ova istraživanja usmjerila su se na funkciju konduktivnih i otporničkih arterija kao pokazatelja endotelne funkcije. Prednost ovoga istraživanja jest uporaba metode LDF koja izravno i neinvazivno mjeri postokluzivni reaktivni odgovor u mikrocirkulaciji kože.

Ovo istraživanje pokazalo je značajno pogoršanje u hiperemičnom protoku krvi nakon jednogminutne krvožilne okluzije u skupini mladih zdravih pojedinaca koji su bili na HSD protokolu tijekom sedam dana. Ova su otkrića važna jer pokazuju da čak i kratkotrajna izloženost (7 dana) prehrani s visokim udjelom soli može voditi razvoju endotelne disfunkcije u mikrocirkulaciji, a potom i u konduktivnim i otporničkim arterijama (što su pokazala prijašnja istraživanja) (138,143,144). Iako u ovom istraživanju nisu zapažene značajne promjene u protoku periferne krvi nakon jednoga tjedna prehrane s niskim udjelom soli, uspoređujući s kontrolnim vrijednostima prije LSD protokola, pronađen je mali porast u postokluzivnom hiperemičnom protoku krvi nakon LSD protokola, što bi moglo značiti da bi duže razdoblje LSD protokola moglo poboljšati protok krvi u mikrocirkulaciji. Ovo je opažanje u skladu s otkrićima Dickinsona i suradnika, koji su pokazali da dva tjedna prehrane s niskim udjelom soli značajno poboljšava endotelnu funkciju mjerenju FMD metodom (146).

6.1.4. Utjecaj dijeta s visokim udjelom soli na biljege endotelne funkcije

Staničke adhezivne molecule, poput ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina, nedavno su se pokazale kao važni biljezi endotelne aktivacije koja prethodi adheziji aktiviranih leukocita te inicira nastanak aterosklerotskih lezija (163,165,170). Budući da se smatra da je endotelna disfunkcija u središtu učinka visokoga unosa soli, postavilo se pitanje bi li jedan tjedan prehrane s visokim i/ili niskim udjelom soli promijenio koncentraciju sCAMs u serumu kao posljedicu endotelne aktivacije. Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da jednodnevni LSD protokol nije uzrokovao promjenu koncentracije sCAMs u serumu, što je očekivano, budući da isti protokol nije ostvario učinak niti na postokluzivni hiperemični protok krvi u mikrocirkulaciji kože, pokazujući da se endotelna funkcija nije promijenila. S druge strane, iako su rezultati ovoga istraživanja pokazali da se postokluzivni hiperemični

protok krvi pogoršao nakon sedmodnevnoga HSD protokola, serumske koncentracije topljivih adhezijskih molekula ostale su nepromijenjene. Prema dostupnim spoznajama, ovo je prvo istraživanje koje se usmjerilo na proučavanje učinka dijeta s visokim udjelom soli na serumsku koncentraciju sCAMs u mladih zdravih ljudi, budući da su postojeća istraživanja te vrste uglavnom uključivala hipertenzivne pacijente. Isto tako, Ferri i suradnici pokazali su da je razina plazmatskog solubilnog E-selektina porasla nakon 2 tjedna prehrane s visokim udjelom soli kod pacijenata osjetljivih na sol, dok se vrijednosti sICAM-1 i sVCAM-1 nisu mijenjale (18). Tadzić i suradnici prikazali su u hipertenzivnih pacijenata visoke koncentracije sICAM-1 i sVCAM-1, a nisku koncentraciju sE-selektina, koji su inače biljezi aktivacije endotelne stanice (170). Ta istraživanja jasno pokazuju da su rezultati nekonzistentni te da je i dalje nepoznato utječu li hipertenzija ili prehrana s visokim udjelom soli na serumske koncentracije sCAMs. Budući da se sCAMs mogu detektirati u serumu kada su prekomjerno izraženi na aktiviranim endotelnim stanicama, tada se smatraju biljezima endotelne aktivacije ili oštećenja, moguće objašnjenje zašto nije zamijećen značajan učinak prekomjernoga unosa soli na serumske koncentracije sCAMs jest da unos soli nije bio dovoljno visok kako bi uzrokovao endotelnu aktivaciju ili njegovo oštećenje, ali je ipak bio dovoljan da ostavi učinak na mehanizme odgovorne za krvožilnu reaktivnost.

Endokan se smatra novim humanim biljegom endotelne aktivacije tebi njegova interakcija s komplementarnim ligandom ICAM-1 na leukocitima (LFA-1) mogla biti važna u adheziji leukocita i interakciji s aktiviranim endotelom (170-172). Važan je rezultat ovog istraživanja snižena plazmatska koncentracija endokana nakon prehrane s visokim udjelom soli, dok LSD protokol nije značajno utjecao na plazmatsku koncentraciju endokana u usporedbi s kontrolnim vrijednostima izmjerenima prije dijetnih protokola. Prema dostupnim spoznajama, nije bilo drugih istraživanja usmjerenih na ovu tematiku. Međutim, postoji zanimljiva povezanost ovih rezultata i rezultata studije Tadzića i suradnika. Njihovi su rezultati pokazali kako je plazmatska razina endokana bila snižena u pacijenata s hipertenzijom, budući da se endokan natječe s ICAM-1 za vezno mjesto na LFA-1 i time ometa adheziju leukocita (hipotetski zaštitni učinak endokana), te da se uz sniženje krvnoga tlaka javlja sniženje ICAM-1 uz popratno sniženje sekrecije endokana (170). Ipak, budući da je endokan relativno nov endotelni biljeg, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se razjasnila njegova uloga u aktivaciji endotela bilo vezanih uz promjenu soli u prehrani, bilo kod hipertenzije.

6.1.5. Učinak inhibicije ciklooksigenaza (COX-1, -2) na postokluzivni hiperemični protok krvi tijekom prehrane s visokim udjelom soli

Važno otkriće ovoga istraživanja jest da jedan tjedan prehrane s visokim udjelom soli značajno poviše plazmatsku razinu TXB₂, stabilnoga metabolita TXA₂, snažnoga vazokonstriktora koji stvara tromboksan A-sintetaza pretvarajući prostaglandin H₂, derivat arahidonske kiseline (čija je sinteza posredovana ciklooksigenazama), u TXA₂. Brojna istraživanja pokazala su da su prostaglandin i tromboksan kritični modulatori krvožilnoga tonusa i u fiziološkim, a i u patofiziološkim stanjima, stoga je regulacija njihova stvaranja i dalje područje intenzivnih istraživanja (21,200). Endotel i glatko mišićje krvnih žila sadržavaju ciklooksigenaze, no endotelne stanice sadržavaju čak i do 20 puta više ciklooksigenaza nego glatkomišićne stanice, što govori u prilog tomu da je izvor povećane ciklooksigenazne aktivnosti upravo endotel (159). Brojni dokazi govore da eikozanoidi (primarno prostaciklin), koji se u normalnim fiziološkim uvjetima stvaraju ciklooksigenaznim putem, induciraju relaksaciju krvnih žila. Međutim, u krvožilnoj patogenezi može postojati neravnoteža gdje vazokonstriktori ovisni o ciklooksigenazi postaju dominantniji. Nadalje, pokazalo se da u brojnim krvožilnim komplikacijama postoje određeni kardiovaskularni rizični čimbenici poput oksidativnoga stresa i dislipidemije, koji su poznati modulatori funkcije ovisne o ciklooksigenazi, a mogu voditi k pogoršanju endotelne funkcije (190-192,200).

Ipak, brojna istraživanja usmjerena na moguću ulogu promjene unosa soli u organizam na aktivnost ciklooksigenaza u krvnim žilama ograničena su. Otkrića ovoga istraživanja sukladna su su istraživanju Lombarda i suradnika koji su pokazali kako tromboksan i prostaglandin H₂, vazokonstriktorni metaboliti ciklooksigenaze, imaju značajnu ulogu u posredovanju paradoksnе konstrikcije u odgovoru na snižen PO₂ u srednjim arterijama mozga štakora hranjenih briketima s visokim udjelom soli (160). S druge strane, Matrougui i suradnici pokazali su da je pogoršanje dilatacije potaknute protokom u normotenzivnih štakora hranjenih briketima s visokim udjelom soli udruženo s potaknutom ekspresijom COX-2 (193).

Nadalje, sljedeći korak u razjašnjavanju uloge ciklooksigenaza u regulaciji krvožilne funkcije jest ispitati učinak indometacina, neselektivnog inhibitora COX-1 i COX-2, te celekoksiba, selektivnog inhibitora COX-2, na postokluzivni hiperemični protok

krvi u mikrocirkulaciji kože. Rezultati ove studije pokazali su kako administracija indometacinom dovodi do oporavka pogoršanog hiperemičnog protoka krvi nakon jednoga tjedna prehrane s visokim udjelom soli, dok celekoksib nije uzrokovao nikakve promjene u hiperemičnom protoku krvi nakon prehrane s visokim udjelom soli. Kako je pokazano da i indometacin i celekoksib značajno smanjuju koncentraciju TXB2 u plazmi, ta otkrića pokazuju kako bi vazokostriktor ovisan o COX-1 mogao igrati značajnu ulogu u pogoršanom hiperemičnom protoku krvi kod osoba koje su bile na dijeti s visokim udjelom soli. Mali broj istraživanja provedenih na životinjskim modelima istražio je moguću ulogu ciklooksigenaze u regulaciji krvožilne funkcije tijekom povećanoga unosa soli. Hermann i suradnici pokazali su da celekoksib smanjuje endotelnu disfunkciju, a i oksidativni stres u štakora s hipertenzijom potaknutom solju (194). Prema dostupnim spoznajama, ovo je prvo istraživanje provedeno na mladim zdravim ljudima koje se bavi ovom problematikom. Primjerice, prijašnja istraživanja pokazala su da je protok krvi u podlaktici pojedinacakoji imaju esencijalnu hipertenziju u odgovoru na vazodilataciju potaknutu acetilkolinom, porastao u prisutnosti indometacina, a i da primjena celekoksiba smanjuje endotelnu disfunkciju u pacijenata s koronarnom bolesti i hipertenzijom. Ipak, specifična uloga COX-1 i COX-2 u regulaciji krvožilne funkcije tijekom povećanoga unosa soli u mladih zdravih ljudi još uvijek se definira i daljnja su istraživanja potrebna kako bi se razjasnila ova problematika.

Naše spoznaje pokazuju da kratkotrajno izlaganje prehrani s visokim udjelom soli vodi značajnim promjenama u metabolizmu arahidonske kiseline. U ovome istraživanju pokazali smo da ciklooksigenazni enzimi, naročito COX-1, igraju važnu ulogu u razvoju krvnožilne (endotelne) disfunkcije nakon prehrane s visokim udjelom soli u mladim zdravim pojedincima.

6.2. Utjecaj blokade receptora AT1 na koncentraciju TXA2 u plazmi i na mikrocirkulaciju kože u populaciji zdravih mladih žena na dijeti s niskim udjelom soli

Rezultati ovoga dijela istraživanja pokazali su da je inhibicija AT1 receptora, tijekom jednoga tjedna u kojemu su mlade zdrave žene bile na dijeti s niskim udjelom soli, značajno podigla razinu TXB2, stabilnoga metabolita TXA2, u plazmi (slika 12.), ne uzrokujući pritom značajnije promjene krvnoga tlaka (tablica 1.) i ne ostvarujući učinak na postokluzivni hiperemični protok krvi u mikrocirkulaciji kože (slika 11.). Međutim, takav

porast razine TXB2 u plazmi nije pronađen kod mladih zdravih žena koje su samo održavale prehranu s niskim udjelom soli (slika 4.), što upućuje na moguću važnost inhibicije receptora AT1 u regulaciji metaboličkoga puta arahidonske kiseline ovisnoga o ciklooksigenazi.

Treba zamijetiti da je ovo prvo istraživanje provedeno na humanom modelu koje je potvrdilo rezultate istraživanja Phillipsa i suradnika, koje je pokazalo da primjena losartana kod štakora podiže plazmatske razine TXA2, vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazi, ne uzrokujući pritom promjene u odgovoru krvožilja skeletnoga mišićja na acetilkolin (dilatacija ovisna o endotelu) i/ili natrijev nitroprusid (dilatacija neovisna o endotelu) (159).

Prijašnja istraživanja naglasila su važnost reninsko angiotenzinskoga sustava u održavanju normalnoga krvožilnog odgovora na razne fiziološke stimuluse, što je učinak posredovan aktivacijom receptora AT1 (181-185). Ipak, budući da je većina istraživanja o utjecaju inhibicije receptora AT1 na krvožilnu funkciju izvedena na populaciji pacijenata s visokim krvnim tlakom i time povećanim rizikom od kardiovaskularnih komplikacija, još uvijek nisu razjašnjeni putovi i mehanizmi kojima ANG II i/ili aktivacija i/ili inhibicija receptora AT1 mogu utjecati na krvnožilnu reaktivnost i funkciju u fiziološkim uvjetima. K tomu, nedavna istraživanja pokazala su da inhibicija receptora AT1 može imati učinak kod zdravih životinja različit od onoga kod životinja s metaboličkim sindromom ili hipertenzijom (195).

Budući da prehrana s niskim udjelom soli već sama po sebi potiče sekreciju renina i stvaranje ANGII, postavlja se pitanje što bi se dogodilo ako bi stvaranje ANGII bilo inhibirano, a inhibicija praćena prehranom s niskim udjelom soli.

U ovom istraživanju sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak značajno su se snizili nakon LSD protokola, a nakon LSD+losartan protokola pokazali su sklonosti sniženju bez promjena među skupinama, što je u skladu s rezultatima istraživanja koja su ispitala utjecaj DASH prehrane na krvni tlak kod normotenzivnih pojedinaca (151). Nadalje, reninska aktivnost plazme, a i plazmatske razine aldosterona značajno su porasle nakon jednoga tjedna LSD protokola, kao i LSD+losartan protokola (tablica 2.). Dok je povišena reninska aktivnost plazme očekivana kao normalan fiziološki odgovor na smanjen unos soli tijekom protokola, očekivani učinak inhibicije receptora AT1 jest sniženje plazmatske razine aldosterona. ANGII obično potiče sintezu i sekreciju aldosterona preko stimulacije receptora AT1 u kori nadbubrežne žlijezde (196). Međutim, prijašnja

istraživanja pokazala su da je selektivni antagonizam receptora AT1 povezan sa znatnim porastom razine ANGII u plazmi te da tako povišene razine ANGII mogu potaknuti sekreciju aldosterona preko receptora AT2 uz inhibiran receptor AT1 – fenomen zvan bijeg aldosterona tijekom inhibicije receptora AT1 (196). To je vjerojatno objašnjenje povišene razine aldosterona u plazmi koja je pronađena u ovom istraživanju. Također, u ovom istraživanju tijekom jednoga tjedna LSD i LSD+losartan protokola snižena je koncentracija albumina u urinu, što može biti objašnjeno kao njihovapotencijalna zaštitna uloga od oštećenja endotela. To je vrlo zanimljivo otkriće budući da su prijašnja istraživanja pokazala da već umjerena redukcija unosa soli smanjuje ekskreciju urina u hipertenzivnih populacija (197,198). Povrh toga, neka istraživanja pokazala su da lijekovi koji inhibiraju reninsko angiotenzinski sustav vjerojatno imaju značajan učinak na sniženu proteinuriju (198). Prijašnja istraživanja provedena na životinjskim modelima pokazala su da ANG II održava normalnu reaktivnost na vazodilatacijske stimuluse u arteriolama i otporničkim arterijama (136, 199-204). Pogoršan odgovor na vazodilatacijske medijatore kod štakora nakon kratkotrajnoga izlaganja prehrani s visokim udjelom soli može biti spriječen održavanjem adekvatne cirkulirajuće razine ANG II, što sugerira da ANG II ima obrambeni učinak kojim ponovno uspostavlja mehanizme odgovorne za relaksaciju u krvnim žilama (136), a koji su posredovani interakcijom ANG II i receptora AT1 (182). Nadalje, hranjenje normotenzivnih štakora briketima s normalnim udjelom soli uz administraciju losartana dramatično mijenja odgovor otporničkih arterija skeletnoga mišićja na akutno smanjenje PO₂ (159). Čini se da se ta paradoksalna vazokostrikcija otporničkih arterija kao odgovor na hipoksiju nakon inhibiranja receptora AT1 losartanom događa uslijed promjene u otpuštanju TXA₂, vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazi, iz endotela (159).

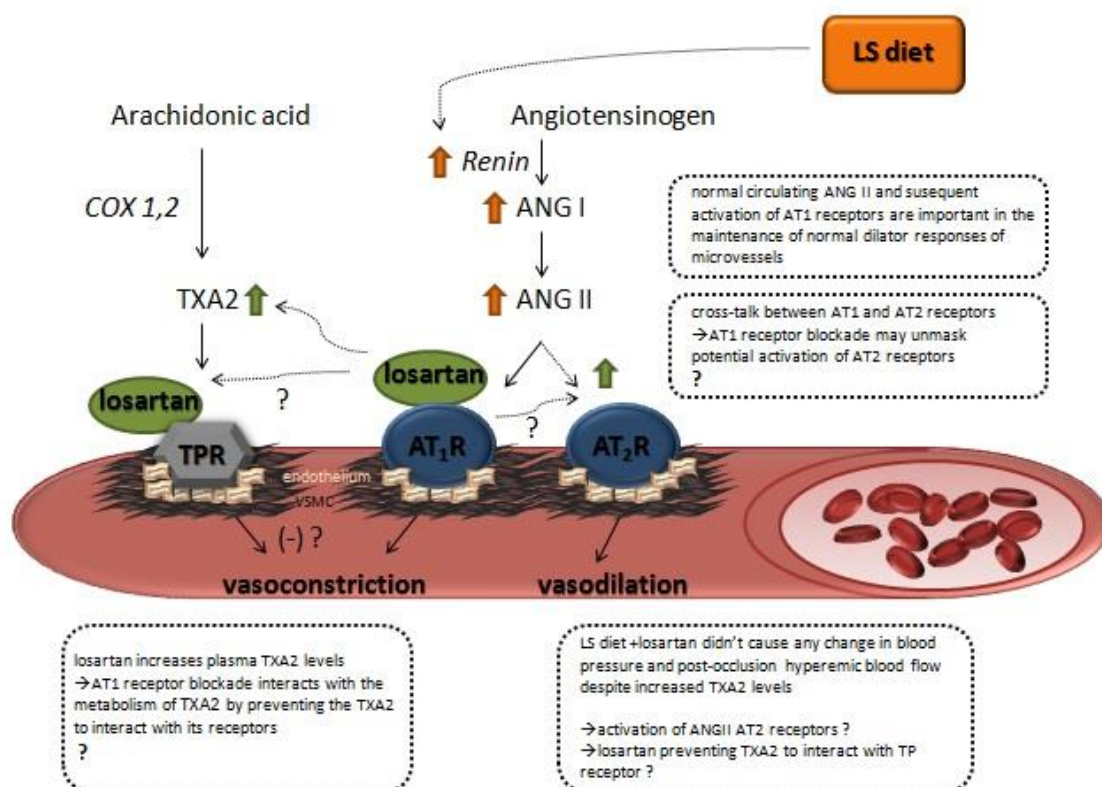
Ipak, nijedno dosadašnje istraživanje nije usmjereno na razjašnjavanje toga mehanizma na humanom modelu, stoga još uvijek preostaje razjasniti ulogu ANG II i aktivaciju njegovih receptora AT1 i AT2 u krvožilnoj reaktivnosti tijekom promjene količine soli u svakodnevnoj prehrani u zdravih pojedinaca. Kako bi se istražilo to pitanje, u ovome istraživanju sudionici su bili tjedan dana na dijeti s niskim udjelom soli uz svakodnevnu primjenu losartana, odnosno bez nje. Smanjena razina natrija u urinu potvrdila je da su ispitanici konzistentno provodili studijski protokol te da su se pridržavali uputa o prehrani. Aktivnost renina u plazmi također se očekivano promijenila pružajući na taj način potvrdu pravilnoga pridržavanja dijetnoga protokola (tablica 2.). Ovi su rezultati pokazali da jedan tjedan primjene losartana tijekom LSD protokola, a i tijekom LSD

protokola bez primjene losartana, nije inducirao nikakve promjene u postokluzivnom hiperemičnom protoku krvi u mikrocirkulaciji kože, dok je jedan tjedan inhibicije receptora AT1 uzrokovao značajan porast plazmatske vrijednosti TXA2, vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazi. Ti su rezultati sukladni rezultatima prijašnjih istraživanja na životinjskim modelima u kojima je hipoksijom uzrokovana paradoksalna vazokonstrikcija arterija u štakora tretiranih losartanom inhibirana indometacinom, što govori da je ciklooksigenazni vazokonstriktor odgovoran za izmijenjen odgovor na smanjen PO₂ kod tih životinja (159).

Jedno od mogućih objašnjenja zašto u istraživanju nije primjećena značajna promjena u postokluzivnom hiperemičnom protoku krvi poslije LSD+losartan protokola jest aktivacija angiotenzinskih receptora AT₂. Pored njihova učinka na krvni tlak, dugotrajna primjena inhibitora receptora AT₁ rezultira višestrukim porastom ANG II u plazmi i time mogućom prekomjernom stimulacijom receptora AT₂ (205-208). Stoga je učinak stimulacije receptora AT₂ postao iznimno važan i u fiziološkim, a i u patološkim stanjima, poput hipertenzije. Nadalje, već je ranije opisano međudjelovanje između tih dvaju podtipova receptora (AT₁ i AT₂) (207,208) i čini se da inhibicija receptora AT₁ može otkriti potencijalne učinke receptora AT₂ koju su inače prikriveni stimulacijom receptora AT₁. Ta potencijalna aktivacija receptora AT₂ tijekom inhibicije receptora AT₁ mogla bi imati važnu ulogu u održavanju mehanizama relaksacije krvnih žila, budući da su prijašnja istraživanja pokazala da receptor AT₂ ima pretežno vazodilatacijsku ulogu te se smatra da bi selektivna stimulacija receptora AT₂ u prisutnosti antagonista receptora AT₁ mogla imati djelotvoran klinički učinak u regulaciji krvnoga tlaka (209-211). Druga istraživanja pokazala su da receptori AT₂ također imaju važnu ulogu u regulaciji tonusa krvnih žila te da je aktivacija receptora AT₂ uključena u vazodilataciju posredovanu protokom (211,212).

Najvažnije otkriće toga dijela istraživanja jest da inhibicija receptora AT₁ značajno podiže razinu TXB₂ u plazmi kod mladih zdravih žena na LSD. Ti podatci dosljedni su sve većem broju dokaza koji pokazuju da losartan ima djelovanje neovisno o receptoru AT₁ (213), a koje je primarno povezano s protuupalnim i antiagregacijskim mehanizmima. Većina istraživanja posvećenih toj tematici izvedena su na životinjskim modelima. Neka su pokazala da losartan može biti uključen u metabolizam TXA₂, vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazi, vjerojatnije interakcijom s njegovim receptorom nego regulacijom njegova stvaranja (214-215). Primjerice, Valentin i suradnici pokazali su da losartan sprječava povećanu propusnost stijenke krvnih žila štakora posredovanu tromboksan A₂/prostanoidnim receptorom (51). Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s

istraživanjem Valentina i suradnika (216), čime potvrđuju da inhibicija receptora AT1 utječe na metabolizam tromboksana A2 vjerojatno sprječavajući interakciju TXA2 s pripadajućim receptorima, i to je moguće objašnjenje zašto protok u mikrocirkulaciji kože ostaje nepromijenjen usprkos porastu plazmatske koncentracije TXB2 (stabilni metabolit TXA2) u ispitanica na LSD+losartan protokolu. Slika 13. sažeto prikazuje promatrane učinke i moguće putove odgovorne za porast razine TXA2 u plazmi uz nepromijenjen protok u mikrocirkulaciji tijekom sedmodnevne inhibicije receptora AT1 u mladih zdravih žena na LSD protokolu.



Slika 13. Moguća uloga inhibicije receptora AT1 u regulaciji TXA2 razine i protoka krvi u mikrocirkulaciji mladih zdravih ispitanica na LS protokolu.

Potencijalna aktivacija receptora AT2 tijekom inhibicije receptora AT1 mogla bi imati značajnu ulogu u održavanju mehanizama relaksacije krvožilja. Drugi mogući put uključuje potencijalnu interakciju inhibicije receptora AT1 i metabolizma tromboksana A2 tako što inhibicija receptora AT1 sprječava interakciju TXA2 s pripadajućim receptorima, što omogućuje da protok krvi u mikrocirkulaciji ostane normalan unatoč povišenoj koncentraciji TXB2 u plazmi.

7. ZAKLJUČCI

- Dok je tjedan dana dijete s niskim udjelom soli doveo do značajnoga sniženja sistoličkoga, dijastoličkoga i srednjega arterijskog tlaka, dijeta s visokim udjelom soli nije dovela do značajnih promjena krvnoga tlaka u populaciji zdravih mladih žena.
- Jedan tjedan prehrane s visokim udjelom soli je izazvao pogoršanje postokluzivnoga hiperemičnog protoka krvi (indikator endotelne funkcije) u mikrocirkulaciji kože, a postokluzivni hiperemički protok ostao je nepromijenjen poslije dijete s niskim udjelom soli.
- Dijeta s niskim udjelom soli nije uzrokovala promjene u mjenim biljezima endotelne funkcije (sCAMPs i endokan), a dijeta s visokim udjelom soli uzrokovala je smanjenje plazmatske koncentracije endokana, bez promjena sCAMPs.
- Dok administracija indometacina dovodi do oporavka pogoršanoga hiperemičnog protoka krvi uzrokovanoga sedmodnevnom dijetom s visokim udjelom soli, administracija celekoksiba nije imala značajan utjecaj na pogoršani postokluzivni hiperemični protok krvi izazvan dijetom s visokim udjelom soli.
- Tjedan dana prehrane s visokim udjelom soli uzrokovao je značajno povišenje plazmatske koncentracije o ciklooksigenazama ovisnoga vazokonstriktora TXA2.
- Iako celekoksib nije imao utjecajna hiperemični protok krvi u mikrocirkulaciji kože, značajno je smanjio plazmatsku koncentraciju TXA2 kao i indometacin, stoga se čini da neki drugi vazokonstriktorni metabolit podrijetlom od ciklooksigenaza (posebice COX-1) vjerojatno ima značajnu ulogu u regulaciji protoka krvi u mikrocirkulaciji tijekom manipulacije količine soli u svakodnevnoj prehrani.
- Jedan tjedan prehrane s niskim udjelom soli uz oralnu primjenu losartana dovodi do porasta plazmatske razine TBX2 (metabolit TXA2), vazokonstriktora ovisnoga o ciklooksigenazi, ne uzrokujući pritom promjene u krvnome tlaku i/ili protoku mikrocirkulacije kože, što upućuje na moguću interakciju losartana i tromboksan A2/prostanoidnog receptora, a ne može se isključiti i moguća interakcija ANG II s receptorima AT2.

8. SAŽETAK

Ključne riječi: prehrana s visokim udjelom soli, endotel, mikrocirkulacija, laser Doppler flowmetrija, ciklooksigenaze, reninsko angiotenzinski sustav, tromboksan A2

Cilj: Istražiti učinak akutnoga povećanja unosa soli na postokluzivni hiperemični protok krvi mikrocirkulacije kože, razjasniti ulogu ciklooksigenaza (COX 1, 2) i njihova vazokonstriktornog produkta tromboksana (TXA2) u regulaciji tkivnoga protoka krvi te odrediti učinak antagonizma receptora AT1 (losartanom) na krvni protok u mikrocirkulaciji i plazmatsku razinu TXA2.

Metode: Ispitanice su (N=64) održavale dijetu s niskim udjelom soli (<40 mmol Na dnevno) tijekom sedam dana te su istovremeno podijeljene u skupinu na dijeti s visokim udjelom soli (HSD skupina; nadomjesna sol-200 mmol Na/dan) i skupinu na dijeti s niskim udjelom soli (LSD skupina; placebo-0 mmol Na/dan). Reaktivnost mikrocirkulacije mjerena je tehnikom laser Doppler (LDF). Jedna skupina primila je 100 mg indometacina 90 minuta, a druga skupina 200 mg celekoksiba 180 minuta prije ponovljenoga LDF mjerenja nakon HSD. Jedan dio ispitanica iz LSD skupine primala je 50 mg losartana dnevno tijekom sedam dana. Plazmatske koncentracije stabilnoga metabolita TXA2 (TXB2), staničnih adhezijskih molekula (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin) i endokana izmjerene su prije i nakon HSD, a TXB2 i poslije LS+losartan protokola.

Rezultati: Nije bilo razlike u krvnom tlaku i puls u nakon HSD, dok se krvni tlak značajno smanjio nakon LSD protokola. LSD nije imao utjecaj, a HSD je izazvao značajno pogoršanje u reaktivnosti mikrocirkulacije. Koncentracija sCAMs nije se značajno mijenjala nakon oba protokola, dok je koncentracija endokana bila značajno smanjena nakon HSD protokola. Indometacin nakon HSD doveo je do oporavka vaskularne reaktivnosti, dok celekoksib nije potaknuo značajnije promjene postokluzivne hiperemije. Koncentracija TXB2 značajno je porasla nakon HSD. I celekoksib i indometacin značajno su smanjili koncentraciju TXB2. LSD+losartan protokol uzrokovao je porast TBX2, bez promjene u krvnome tlaku i/ili protoku mikrocirkulacije kože.

Zaključak: Jedan tjedan HSD uzrokovao je pogoršanje vaskularne reaktivnost mikrocirkulacije, koja se oporavila nakon primjene indometacina, a nije bila promijenjena nakon primjene celekoksiba. Kako su se povišene vrijednosti TBX2 izazvane HSD

protokolom snizile nakon primjene celekoksiba, čini se da neki drugi vazokonstriktorni metabolit podrijetlom od ciklooksigenaza ima značajnu ulogu u regulaciji protoka krvi u mikrocirkulaciji tijekom promjene količine soli u prehrani. Inhibicija receptora AT1 može voditi aktivaciji receptora AT2 i/ili interakciji s TXA2/prostanoid receptorom, koji održavaju hiperemiju, unatoč povišenoj razini vazokonstriktora TXA2.

9. SUMMARY

Key words: high salt diet, endothelium, microcirculation, laser Doppler flowmetry, cyclooxygenase, renin angiotensin system, thromboxaneA₂

Objective: To investigate the effect of acute salt loading on skin microcirculatory hyperemic blood flow and in particular the role of cyclooxygenase (COX 1,2) and its derived vasoconstrictor thromboxane (TXA₂) in tissue blood flow regulation. To determine the effect of AT1 receptor antagonism using losartan on microcirculatory blood flow and on plasma level of TXA₂.

Methods: All participants (N=64) maintained specific low salt diet (<40 mmol Na/day) through 7 days and simultaneously were divided in two groups: high salt diet (HSD) group (salt supplement-200 mmol Na/day) and low salt diet (LSD) group (placebo supplement-0 mmol Na/day). Microvascular reactivity was assessed by laser Doppler flowmetry (LDF). One group received 100 mg of indomethacin 90 minutes, and another group 200 mg of celecoxib 180 minutes before repeated LDF measurement after HSD. One group of participants on LSD was given 50 mg/per day of losartan (LSD+losartan group) for 7 days. Plasma concentration of stable TXA₂ metabolite [TXB₂], cell adhesion molecules [ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin] and endocan were measured before and after diet protocols.

Results: No significant changes in BP and HR occurs after HSD, while BP was significantly reduced after LSD. While LSD didn't has significant effect, HSD caused significant impairment in microvascular reactivity. sCAMs didn't change after both HSD and LSD, while endocan concentration significantly decreased after HSD. Indomethacin administration after HSD restored microvascular reactivity to control values, while celecoxib administration didn't induce significant change in post occlusion blood flow. Plasma TXB₂ was increased after HSD. Both celecoxib and indomethacin significantly decreased TXB₂ levels after HSD. LSD+losartan significantly increased TXB₂ plasma levels without causing changes in microvasular reactivity.

Conclusion: These results have shown that one week of HSD impaired microvascular reactivity that was restored after indomethacin administration and wasn't changed after celecoxib administration. Increased levels of [TXB₂] after HSD were decreased after celecoxib administration what suggests that some other COX-1 derived vasoconstrictor metabolite may play more significant role in regulation of microvascular blood flow during

sodium manipulation. Blockade of AT1 receptor could lead to activation of AT2 receptors and/or interaction with TXA₂/prostanoid receptors, which maintain hyperemia, despite the increased level of TXA₂.

10. LITERATURA

- 1) MacGregor GA, de Wardener HE. Salt, Diet and Health. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
- 2) Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol* 2009;38:791-813.
- 3) Premuzic V, Erceg I, Jovanovic A, Reiner Z, Jelakovic B (2010). Unos soli u odrasloj populaciji. *Hrvatski casopis za javno zdravstvo* vol 6, 21.
- 4) James G, Baker T (1995). Human population biology and blood pressure: evolutionary and ecological consideration and interpretations of population studies; in Laragh JH, Brenner BM (eds): *Hypertension, Diagnosis and Management*, ed 2. New York, Raven Press, pp 115-135.
- 5) Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 h urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* 1988; 297:319-328.
- 6) He FJ, MacGregor GA. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52:363-382.
- 7) Tobian L, Hanlon S. High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension* 1990;15:900-903.
- 8) Perry IJ, Beevers DG. Salt intake and stroke: a possible direct effect. *J Hum Hypertens* 1992;6:23-25.
- 9) Messerli FH, Schmieder RE, Weir MR. Salt. A perpetrator of hypertensive target organ disease? *Arch Intern Med* 1997;157:2449-2452.
- 10) Cianciaruso B, Bellizzi V, Minutolo R, Tavera A, Capuano A, Conte G, De Nicola L. Salt intake and renal outcome in patients with progressive renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:296-301.
- 11) Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2009; 339:b4567.

- 12) Bibbins-Domingo K, Chertow GM, Coxson PG, et al. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2010;362:590-9.
- 13) He FJ, MacGregor GA. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J Hum Hypertens* 2002;16:761-70.
- 14) He FJ, MacGregor GA. Effect of longer term-modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;CD004937.
- 15) Hooper L, Bartlett C, Davey SG, Ebrahim S. Advice to reduce dietary salt for prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD003656.
- 16) Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2002; 4(4):274-6.
- 17) Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Coca A. Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension. *Hypertension* 2001; 37:444-448.
- 18) Ferri C, Bellini C, Desideri G, Giuliani E, De Sisti L, Cicogna S, Santucci A. Clustering of endothelial markers of vascular damage in human salt-sensitive hypertensive: influence of dietary sodium load and depletion. *Hypertension* 1998; 32:862-868.
- 19) Bragulat E, de la Sierra A. Salt intake, endothelial dysfunction, and salt-sensitive hypertension. *J Clin Hypertens* 2002; 4:41-6.
- 20) Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities*. Stuttgart: Schattauer, 1997, 1-26.
- 21) Ruzic A, Miletic B, Noal AI, Persic V, Razov Radas M, Vcev A. Endotelna disfunkcija u "enigmatskoj slagalici" kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas* 2009; 6(1):2-15.
- 22) Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 39:287-324.

- 23) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36.
- 24) Iruela-Arispe ML, Dvorak, HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 1997; 78:672-7.
- 25) Chappey O, Wautier MP, Wautier JL. Structures and functions of the endothelium. *Rev Prat* 1997; 47:2223-6.
- 26) Thurston G, Baluk P, McDonald DM. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation* 2000; 7:67-80.
- 27) Dzau VJ, Braun Dullaues RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002; 8:1249-56.
- 28) Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng* 2005;33: 1714-8.
- 29) Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:237-52.
- 30) Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:4103-11.
- 31) Belohlavkova S, Simak J. Adhesion receptors of the vascular endothelium and their role in acute inflammation. *Cesk Pysiol* 1999; 48:51-61.
- 32) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
- 33) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:9265-9.
- 34) Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition of endothelium-derived nitric-oxide. *J Clin Invest* 1990; 85:587-90.

- 35) Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- 36) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H1145-9.
- 37) Anderson EA, Mark AL. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation* 1989; 79:93-100.
- 38) Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-6.
- 39) Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153:1251-6.
- 40) Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2:997-1000.
- 41) Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89:2035-40.
- 42) Joanides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C et al. Nitric oxide is responsible for flow-mediated dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91:1314-9.
- 43) Joanides R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Luscher TF, Thuillez C. Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension* 1995; 26:327-31.
- 44) Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial “stunning” following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res* 1996; 32:822-9.
- 45) Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; 96:3042-7.

- 46) Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M et al. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 2000; 102:994-9.
- 47) Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter G, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102:1000-6.
- 48) Koller A, Kaley G. Prostaglandins mediate arteriolar dilation to increased blood flow velocity in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res* 1990; 67:529-34.
- 49) Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263:663-5.
- 50) Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol* 1992; 105:485-9.
- 51) Duvall WL. Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med* 2005; 72:71-80.
- 52) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396:269-72.
- 53) Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 2007; 49:590-6.
- 54) Larsen BT, Gutterman DD, Sato A, Toyama K, Campbell WB, Zeldin DC et al. Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 2008; 102:59-67.
- 55) Taddei S, Versari d, Cipriano A, Ghiadoni L, Galetta F, Franzoni F, et al. Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:508-15.
- 56) Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, Weintraub NL. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and

activation of K(+) channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281:R246-53.

- 57) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368:850-3.
- 58) Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:1013-28.
- 59) Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res* 2002; 90:800-6.
- 60) Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JC, Jr. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:765-71.
- 61) Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am j Physiol* 1985; 248:C550-6.
- 62) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by cultured endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5.
- 63) Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, Von SL, Stulz P, Boulanger C et al. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 1990; 66:1088-94.
- 64) Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, takaku F, Yanagisawa m, Masaki T et al. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:859-64.
- 65) Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991; 88:1054-7.

- 66) Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Yasunari K, horio T, Kurihara N et al. Production of endothelin by cultured porcine endothelial cells: modulation by adrenaline. *J Hypertens Suppl* 1989; 7:S130-1.
- 67) Ohta K, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Emori T, Shichiri M et al. Cytokine-induced release of endothelin-1 from porcine renal epithelial cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169:578-84.
- 68) Miyamori I, Takeda Y, Yoneda t, Iki K, Takeda R. interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from the rat mesenteric artery. *Life Sci* 1991; 49: 1295-300.
- 69) Woods M, Bishop-Bailey D, Pepper JR, Evans TW, Mitchell JA, Warner TD. Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary artery and saphenous vein smooth-muscle cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31(Suppl1):S348-50.
- 70) Dohi Y, Hahn AW, Boulanger CM, Buhler FR, Luscher TF. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 1992; 19:131-7.
- 71) Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhausl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 1990; 81:1415-8.
- 72) Kiely DG, Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man. *Cardiovasc Res* 1997; 33:378-86.
- 73) Baunting S, Moncada S, Vane JR. the prostacyclin-thromboxane A” balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull* 1983; 39:271-6.
- 74) Marwali MR, Mehta JL. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost* 2006; 96:401-6.
- 75) Raitikari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial function. *Ann Med* 2000; 32:293-304.
- 76) Cybulsky Mi, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 315:1046-51.

- 77) Ewenstein MG. Vascular biology of von Willebrand factor. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer, 1997, 107-22.
- 78) Haller H. Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer, 1997, 273-98.
- 79) Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 2005; 118:4103-11.
- 80) Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol* 2001; 280:H2484-8.
- 81) Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:168-175.
- 82) Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2000; 902:230-240.
- 83) Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86 Suppl:III12-9.
- 84) Chiu J, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: patophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 2011; 91:327-387.
- 85) Aboyans V, Criqui MH, Denenberg JO, Knoke JD, Ridker PM, Fronek A. Risk factors for progression of peripheral arterial disease in large and small vessels. *Circulation* 2006; 113:2623-2629.
- 86) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.
- 87) Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
- 88) Ross R, Glomset J. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976; 295:369-377.

- 89) Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine – what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7:59-62
- 90) Fortuno A, Olivan S, Beloqui O et al. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 2004; 22:2169-2175
- 91) Lerman A, Holmes DR, Bell MR, Garrat KN, Nishimura RA, Burnet JC. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995; 92:2426-2431.
- 92) Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14:506-512.
- 93) Hwang SJ, Mallantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkll E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96:4219-4225.
- 94) Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003;107:363-369.
- 95) Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107:499-511.
- 96) Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006; 113:2335-2362
- 97) Iribarren C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:5-6

- 98) Ballantyne C, Hoogeveen R, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch Intern Med* 2005; 165:2479-2484
- 99) Yang E, McConnell J, Lennon R et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is an independent marker for coronary endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 4:107-111
- 100) Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med* 2000; 32:293-304.
- 101) Ravani P, Tripepi G, Malberi F et al. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risk modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2449-2455.
- 102) Fliser D, Kronenberg F, Kielstein J et al. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2456-2461
- 103) Sarrazin S, Adan E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Ladofi C, Lortat-Jacob H, Bechard D, Lassalle P, Delehedde M. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): A Potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765(1):25-37.
- 104) Lee KW, Lip GYH, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6 and prognosis in patients with acute coronary syndrome. *Blood* 2005; 105:526-32
- 105) Cines DB, Pollak ES, Buck CA. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 1:3527-61
- 106) Mulin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999; 92:2951-58

- 107) Mallat Z, Benamer H, Hugel B et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101:841-843.
- 108) Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2004; 41:211-217.
- 109) Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H1004-H1009.
- 110) Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 2000; 65:215-220.
- 111) Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1185-1189
- 112) Cracowski J, Minson CT, Salvat-Melis m, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(9):503-8.
- 113) Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovasc Med J* 2010; 4:302-312.
- 114) Boo YC, Sorescu G, Boyd N et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms. Role of protein kinase A. *J Biol Chem* 2002; 277:3388-96.
- 115) Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:325-33.
- 116) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of brachial artery. A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll cardiol* 2002; 39:257-65.

- 117) Joannides R, Haefeli WE, Linder L et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91:1314-9.
- 118) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-5.
- 119) Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens* 2005; 18:3-10.
- 120) Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 2002; 105:213-7.
- 121) Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, et al. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens* 1998; 16:2079-84.
- 122) Saito M, Okayama H, Nishimura K et al. Possible link between large artery stiffness and coronary flow velocity reserve. *Heart* 2008; 94:e20.
- 123) Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:554-66.
- 124) Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Muratori I, Carella M, Novo S. Endothelial dysfunction and carotid lesions are strong predictors of clinical events in patients with early stages of atherosclerosis: a 24-month follow-up study. *Coron Artery Dis* 2008; 19:139-44.
- 125) Corrado E, Camarda P, Coppola G, et al. Prognostic role of endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness in patients undergoing coronary stent implantation. *Int Angiol* 2009; 28:12-9.
- 126) Wohlin M, Helmersson J, Sandstrom J, et al. Both cyclooxygenase- and cytokine-mediated inflammation are associated with carotid intima-media thickness. *Cytokine* 2007; 38:130-6.

- 127) Shimizu M, Kohara S, Yamamoto M, Ando Y, Haida M, Shinohara Y. Significant relationship between platelet activation and intramedia thickness of the carotid artery in patients with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Res* 2006; 117:647-52.
- 128) Ter Avest E, Stalenhoef AF, de Graaf J. What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction? *Clin Sci (Lond)* 2007; 112:507-16.
- 129) Iglesias del SA, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Witteman JC. carotid intima-media thickness at different sites: relation to incident myocardial infarction; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2002; 23:115-26.
- 130) Franco V, Oparil S. Salt Sensitivity, a Determinant of Blood Pressure, Cardiovascular Disease and Survival. *JOURNAL OF THE American College of Nutrition* 2006; 35(3):247S-255S.
- 131) Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 286:H575-H583.
- 132) Zhu J, Huang T, Lombard JH. Effect of High-Salt Diet on Vascular Relaxation and Oxidative Stress in Mesenteric Resistance Arteries. *J Vasc Res* 2007; 44:382-390.
- 133) McEwen ST, Schmidt JR, somber L, de la Cruz L, Lombard JH. Time-Course and Mechanisms of Restored Vascular Relaxation by Reduced Salt Intake and Angiotensin II Infusion in Rats Fed a High-Salt Diet. *Microcirculation* 2009; 16(3):220-234.
- 134) Drenjancevic-Peric I, Weinberg BD, Greene AS, Lombard JH. Restoration of cerebral vascular relaxation in renin congenic rats by introgression of the Dahl R renin gene. *Am J Hypertens* 2010; 23(3):243-8.
- 135) Hernandez I, Cowley AW Jr, Lombard JH, Greene AS. Salt intake and angiotensin II alter microvessel density in the cremaster muscle of normal rats. *Am j Physiol heart circ Physiol* 1992; 263:H664-H667.

- 136) Weber DS and Lombard JH. Angiotensin II AT1 receptors preserve vasodilator reactivity in skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol heart Circ Physiol* 2000; 280:H2196-H2202.
- 137) Durand MJ, raffia G, Weinberg BD, Lombard JH. Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299:H1024-H1033.
- 138) Stein CM, Nelson R, Brown M, Wood M, Wood AJJ. Dietary sodium intake modulates vasodilation mediated by nitroprusside but not by metacholine in the human forearm. *Hypertension* 1995; 25:1220-1223.
- 139) Miyoshi A, Suzuki H, Fujiwara M, Masai M, Iwasaki T. Impairment of endothelial function in salt-sensitive hypertension in humans. *Am J Hypertens* 1997; 10:1083-1090.
- 140) Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Coca A. Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension. *Hypertension* 2001; 37:444-448.
- 141) Dishy V, Sofowora GG, Imamura H, Nishimi Y, Xie HG, Wood AJJ, Stein CM. Nitric oxide production decreases after salt loading but is not related to blood pressure changes or nitric oxide-mediated vascular responses. *Journal of Hypertension* 2003; 21:153-157.
- 142) Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Sasaki S, Hara K, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. Sodium Chloride Loading Does Not Alter Endothelium-Dependent Vasodilation of Forearm Vasculature in Either Salt-Sensitive or Salt-resistant Patients with Essential Hypertension. *Hypertens Res* 2001; 24:711-716. ,
- 143) Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse Cardiovascular Effects of Acute Salt Loading in Young Normotensive Individuals. *Hypertension* 2008; 51:1525-1530.
- 144) Liu FQ, Mu JJ, Liu ZQ, Huang Q, Yuan ZY, Lian QF, Zheng SH. Endothelial dysfunction in normotensive salt-sensitive subjects. *Journal of Human Hypertension* 2012; 26:247-252.

- 145) Starmans-Kool MJ, Stanton AV, Xu YY, McGThom CA, Parker KH, Hughes AD. High dietary salt intake increases carotid blood pressure and wave reflection in normotensive healthy young men. *J Appl Physiol* 2011; 110:468-471.
- 146) Dickinson KM, Clifton PM, Keogh JB. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2011; 93:500-5.
- 147) INTERSALT Cooperative Research Group. INTERSALT Study: an international study of electrolyte excretion and blood pressure: Results for 24-hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ* 1988; 297:319-328.
- 148) Elliot P, Stamler J, Nichols R et al. for the INTERSALT Cooperative Research Group. INTERSALT revisited: Further analyses of 24-hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. *BMJ* 1996; 312:1249-1253.
- 149) Hanneman RL: INTERSALT. Hypertension rise with age revisited. *BMJ* 1996; 312:1283-1284.
- 150) Vollmer WM, Sacks FM, Ard J, et al. DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects of diet and sodium intake on blood pressure: subgroup analysis of the DASH-Sodium trial. *Ann Intern Med* 2001; 135:1019-1028.
- 151) Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM et al. DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects in blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med* 2001; 344:3-10.
- 152) Obarzanek E, Proschan MA, Vollmer WM, et al. Individual blood pressure responses to changes in salt intake. Results from the DASH-Sodium Trial. *Hypertension* 2003; 42:459-467.
- 153) Akita S, Sacks FM, Svetkey LP, Conlin PR, Kimura G for the DASH-Sodium Trial Collaborative Research Group. Effects of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet on the pressure-natriuresis relationship. *Hypertension* 2003; 42:8-12.
- 154) Dickinson KM, Keogh JB, Clifton PM. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:485-90.

- 155) Huxley VH. Sex and the cardiovascular system: the intriguing tale of how women and men regulate cardiovascular function differently. *Advan in Physiol Edu* 2007; 31:17-22.
- 156) Miller VM. Sex-based differences in vascular function. *Women's Health* 2010; 6(5):737-752.
- 157) Drenjancevic Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney Blood Press Res* 2011; 34:1-11.
- 158) Drenjancevic-Peric I, Weinberg BD, Greene AS, Lombard JH. Restoration of cerebral vascular relaxation in renin congenic rats by introgression of the Dahl R renin gene. *Am J Hypertens* 2010; 23(3):243-8.
- 159) Phillips SA, Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC, Lombard JH. Chronic AT(1) receptor blockade alters mechanisms mediating responses to hypoxia in rat skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2):H545-52.
- 160) Lombard JH, Sylvester FA, Phillips SA, Frisbee JC. High-salt diet impairs vascular relaxation mechanisms in rat middle cerebral arteries. *AJP* 2002; 284:H1124-1133.
- 161) Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol heart Circ Physiol* 2004; 286:H575-H583.
- 162) Sylvester FA, Stepp DW, Frisbee JC, Lombard JH. High salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(1):H353-63.
- 163) Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002; 105:546-549.
- 164) Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:23-37.
- 165) Goligorsky MS. Clinical assessment of endothelial dysfunction: combine and rule. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:617-624.

- 166) Wright CI, Kroner CI, Draijer R. Non-invasive methods and stimuli for evaluating the skin's microcirculation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2006; 54:1-25.
- 167) De Backer D, Hollanberg S, Boerma C, Goedhart, Buchele G, Ospina-Tascon G et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table. *Critical Care* 2007; 11 (5).
- 168) Rossi M, Taddei S, Fabbri A, Tintori G, Credidio L, Visrdis A, et al. Cutaneous vasodilatation to acetylcholine in patients with essential hypertension. *J cardiovasc Pharmacol* 1997; 29:406-11.
- 169) Stewart J, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adler S, Garrick R et al. Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *AJP* 2004; 287:H2687-H2696.
- 170) Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The Effects of Arterial Blood Pressure Reduction on Endocan and Soluble Adhesion Molecules (CAMs) and CAMs Ligands Expression in Hypertensive Patients on Ca-Channel Blocker Therapy. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37:1-9.
- 171) Sarrazin S, Adam E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Landolfi C, Lortat-Jacob H, Bechard D, Lassalle P, Delehedde M. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765(1):25-37.
- 172) Sarrazin S, Maurage CA, Delmas D, Lassalle P, Delehedde M. Endocan as a Biomarker of Endothelial Dysfunction in Cancer. *J Canc Sci Ther* 2010; 2(2):47-52.
- 173) Baudouin M, Meyer P, Worcel M. Specific binding of 3H-angiotensin II in rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 42:434-440.
- 174) Devynck MA, Pernollet MG, Meyer P, Femandjian S, Fromageot P. Angiotensin receptors in smooth muscle cell membranes. *Nat New Biol* 1973; 245:55-58.

- 175) Inagami T, Guo DF, Kitami Y. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. *J Hypertens* 1994; 12:S83-S94.
- 176) Matsubara H, Inada M. Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors: expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists. *Endocr J* 1998; 45:137-150.
- 177) Chrysant SG. The Role of Angiotensin II Receptors in Stroke Protection. *Curr Hypertens Rep* 2012; 14(3):202-8.
- 178) Horiuchi M, Iwanami J, Mogi M. Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123(4):193-203.
- 179) Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179:1361-1367.
- 180) Song K, Kurobe Y, Kanehara H, Wada T, Inada Y, Nishikawa K, Miyazaki M. Mapping of angiotensin II receptor subtypes in peripheral tissues of spontaneously hypertensive rats by in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22(Suppl.):S17-S19.
- 181) Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombard JH, Greene AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 275:H1395-H1403.
- 182) Weber DS, Lombard JH. Angiotensin II AT1 receptors preserve vasodilator reactivity in skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2196-H2202.
- 183) Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A2 receptor antagonist inhibit endothelium dependent contractions. *Hypertension* 1990; 15:699-703.
- 184) Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Reduced Angiotensin II and Oxidative Stress Contribute to Impaired Vasodilation in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. *Hypertension* 2005; 45:687-691.

- 185) Phillips SA, Lombard JH. Chronic AT1 receptor blockade alters the mechanisms mediating hypoxic dilation in middle cerebral arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46:706-712.
- 186) Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, Tatge H, Drexler H. Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type I receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation* 2001; 103:799-805.
- 187) Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2000; 101:2349-2354.
- 188) Muntzel M, Drueke T. A comprehensive review of the salt and blood pressure relationship. *Am J Hypertens* 1992; 5:1S-42S.
- 189) Hamlyn JM, Manuta P. Endogenous Ouabain: A link between sodium intake and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2011; 13:14-20.
- 190) Armstead WM. Cyclooxygenase-2-dependent superoxide generation contributes to age-dependent impairment of G protein-mediated cerebrovasodilation. *Anesthesiology* 2003; 98:1378–1383.
- 191) Pitt B, Pepine C, Willerson JT. Cyclooxygenase-2 inhibition and cardiovascular events. *Circulation* 2002; 106:167–169.
- 192) Strand V, Hochberg MC. The risk of cardiovascular thrombotic events with selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 4 2002; 7:349–355.
- 193) Matrougi K, Loufrani L, Veby BI, Henrion D. High NaCl intake decreases both flow-induced dilation and pressure-induced myogenic tone in resistance arteries from normotensive rats: involvement of cyclooxygenase-2. *Pharmacol Toxicol* 2001; 89(4):183-7.
- 194) Hermann M, Camici G, Fratton A, Hurlimann A, Tanner FC, Hellermann JP et al. Differential Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors on Endothelial Function in Salt-Induced Hypertension. *Circulation* 2003; 108:2308-2311.
- 195) Reed R, Kolz C, Potter B, Rocic P. The mechanistic basis for the disparate effects of angiotensin II on coronary collateral growth. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28:61-67.

- 196) [Naruse M](#), [Tanabe A](#), [Sato A](#), [Takagi S](#), [Tsuchiya K](#), [Imaki T](#), [Takano K](#). Aldosterone Breakthrough During Angiotensin II Receptor Antagonist Therapy in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 2002; 40:28-33.
- 197) Verhave JC, Hillege HL, Burgerhof JG, Janssen WM, Gansevoort RT, Navis GJ, de Zeeuw D, de Jong PE. Sodium intake affects urinary albumin excretion in overweight subjects. *J Intern Med* 2004; 256:324-30.
- 198) Swift PA, Markandu ND, Sagnella GA, He FJ, Macgregor GA. Modest salt reduction reduces blood pressure and urine protein excretion in black hypertensives. A randomized control trial. *Hypertension* 2005; 46:308-12.
- 199) Heeg JE, de Jong PE, van der Hem GK, de Zeeuw D. Efficacy and variability of the antiproteinuric effect of ACE inhibition by lisinopril. *Kidney Int* 1989; 36:272-279.
- 200) Hernandez I, Cowley AW Jr., Lombard JH, Greene AS. Salt intake and angiotensin II alter microvessel density in the cremaster muscle of normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992; 263:H664-H667.
- 201) Lombard JH, Bizub D, Weber DS, Greene AS. Acute elevation of salt intake impairs electrical and mechanical responses of rat middle cerebral arteries to reduced PO₂ and iloprost via suppression of angiotensin II (Abstract). *Microcirculation* 1997; 5:159.
- 202) Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 1996; 27:760-765.
- 203) Nurkiewicz TR, Boegehold MA. Reinforcement of arteriolar myogenic activity by endogenous ANG II: susceptibility to dietary salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H269-H278.
- 204) Frisbee JC, Weber DS, Lombard JH. Chronic captopril administration decreases vasodilator responses in skeletal muscle arterioles. *Am J Hypertens* 1999; 12:705-715.
- 205) Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001; 89:650-660.
- 206) Mazzolai L, Maillard M, Rossat J, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: a direct comparison of three AT₁ receptor antagonists. *Hypertension* 1999; 33:850-855.
- 207) Maeso R, Navarro-Cid J, Munoz-Garcia R, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V. Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings

- from spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension* 1996; 28:967-972.
- 208) Muller C, Endlich K, Barthelmebs M, Helwig JJ. AT2-antagonist sensitive potentiation of angiotensin II-induced vasoconstrictions by blockade of nitric oxide synthesis in rat renal vasculature. *Br j pharmacol* 1997; 122:1495-1501.
- 209) Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurifara K, Marusawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawanda N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 1999; 104:925-935.
- 210) Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT2 receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT1 receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34:1112-1116.
- 211) Henrion D, Kubis N, Levy BI. Physiological and Patophysiological Functions of the AT2 Subtype Receptor of Angiotensin II: From Large Arteries to the Microcirculation. *Hypertension* 2001; 38:1150-1157.
- 212) Matrougui K, Levy BI, Henrion D. Tissue angiotensin II and endothelin-1 modulate differently the response to flow in mesenteric resistance arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2000; 130:521-526.
- 213) Usui M, Egashira K, Tomita H, Koyanangi M, Katoh M, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Matsushima K, Takeshita A. Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 2000; 101:305-310.
- 214) Munoz-Garcia R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V. Losartan reduces constrictor responses to endothelin-1 and the thromboxane A2 analogue in aortic rings from spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. [J Hypertens.](#) 1997; 15(12 Pt 2):1677-84.
- 215) Bertolino F, Valentin JP, Maffre M, Jover B, Bessac AM, John GW. Prevention of thromboxane A2 receptor-mediated pulmonary hypertension by a nonpeptide angiotensin II type 1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268(2):747-52.

- 216) Valentin JP, Jover B, Maffre M, Bertolino F, Bessac AM, John GW. Losartan prevents thromboxane A₂/prostanoid (TP) receptor mediated increase in microvascular permeability in the rat. *Am J Hypertens*. 1997; 10(9 Pt 1):1058-63.

11.ŽIVOTOPIS

Ana Čavka, dr.med.

Datum rođenja: 31. kolovoza 1984.

Adresa: Cvjetkova 22a, 31 000 Osijek, Hrvatska

Email adresa: cavka.ana@gmail.com

Matični broj znanstvenika: 322935

Obrazovanje:

- listopad 2003. - svibanj 2009.: Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- studeni 2009. – do danas: Poslijediplomski studij *Biomedicina i zdravstvo*, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Radno iskustvo:

- rujan 2009. - rujan 2010.: pripravnički staž doktora medicine u Kliničkom bolničkom centru Osijek
- studeni 2009. - do danas: asistentica na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- veljača 2010. - do danas: vanjska suradnica u naslovnom suradničkom zvanju asistenta na predmetu *Fiziologija s patofiziologijom* na Studiju fizioterapije Veleučilišta Lavoslava Ružičke u Vukovaru
- lipanj 2011. - srpanj 2012.: istraživačka suradnica u Vascular Biology Laboratory, Department of Physical Therapy, College of Applied Health Sciences University of Illinois, Chicago, IL, SAD
- studeni 2012. - do danas: specijalizantica Opće interne medicine na Klinici za unutarnje bolesti Kliničkoga bolničkog centra Osijek

Tečajevi trajnoga usavršavanja:

- prosinac 2009. – tečaj za rad metodom „Laser Doppler Flowmetry“ na Department of Physiology, School of Medicine University of Szeged, Szeged, Mađarska

- siječanj 2010. – Temeljni tečaj teorijske i praktične osnove visokorezolucijskog ultražvučnog testa protokom posredovane dilatacije perifernih arterija čovjeka (engl. FMD – Flow Mediated Dilation) u Specijalnoj bolnici za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma, Opatija, Hrvatska.
- 22.-23. 3.2010. – sudjelovanje na Perimed® radionici o mikrocirkulaciji na School of Medicine University of Szeged, Szeged, Mađarska
- 29.3.-2.4.2010. – **Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika I. kategorije – Klinički terapijski pokus. Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska**
- 10.-11.9.2010. – **Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika I. kategorije – Dijagnostika i liječenje upalnih bolesti crijeva. Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska**
- 29.3.2011. - Meta Analysis Workshop (faciliators:Higgins, J. and Altman, D.) **Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska**
- 1.-2.4.2011. - **Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika I. kategorije – Suvremeni pristupi u dijagnostici i liječenju tumora dojke. Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska.**
- 15.4.2011. - **Training in Transgenetic Research Metodology in Biomedicine and Biotechnology (project CABCOS). Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska**
- 20.6.2011. - HIPPA On-line Training in Human Subject Protection - Privacy Rule requirements for research projects, University of Illinois, Chicago, IL, SAD
- 10.12.2011.–Tečaj DL-101 Osnovni tečaj o intelektualnom vlasništvu, WIPO (World Intellectual Proprety Organisation) program, online tečaj
- 10.-14.12.2012. - Laboratory immunetechniques in molecular biology research, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska „Health Impulse“, Pečuh, Mađarska
- 11.-15.1.2013. - Developmental biology of peripheral lymphoid tissues – crossroad between immunology and embryology, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska „Health Impulse“, Pečuh, Mađarska

Strani jezici: engleski jezik - aktivno

Stipendije i nagrade:

- Stipendija za sudjelovanje na „23rd European Meeting On Hypertension and Cardiovascular Protection – ESH2013“, Milano, Italija, 2013.
- Stipendija za sudjelovanje na „21st European Meeting On Hypertension and Cardiovascular Protection – ESH2011“, Milano, Italija, 2011.
- Nagrada za postersku prezentaciju na „RECOOP HST Bridges 6th Annual Scientific Meeting“, 8.-10.4.2011, Bratislava, Slovačka
- Nagrada za oralnu prezentaciju na „Second International Symposium on Hypertension Osijek“, 18.-21.11.2010, Osijek, Hrvatska
- 3. mjesto u hrvatskom finalu FameLab-a, natjecanju za mlade znanstvenike, 2010.
- Rektorova nagrada Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku za nadarene studente, 2009.
- Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske za nadarene studente, 2003. – 2009.

Aktivnost u znanstvenim projektima:

- 30.5.-30.11.2011. Fond Jedinstvo uz pomoć znanja (Unity through Knowledge Fund, UKF), projektna agencija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. „UKF Grant Agreement No. 87/11 Influence of diet and exercise on vascular reactivity and vascular stiffness“. Sudjelovanje kao glavni istraživač na projektu u kojem je Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku bio vodeća institucija na Vascular Biology Laboratory at the College of Applied Health Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, SAD institucija domaćin

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Cavka, Ana; Cosic, Anita; Grizelj, Ivana; Koller, Akos; Jelakovic, Bojan; Lombard, Julian H; Phillips, Shane A; Drenjancevic, Ines. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A2 (TXA2) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. *Kidney and Blood Pressure Research* (rad u postupku objavljivanja)
2. Kibel, Aleksandar; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Falck, John R.; Drenjancevic, Ines. Effects of hyperbaric oxygenation on vascular reactivity to angiotensin II and angiotensin-(1-7) in rats. // *Undersea and Hyperbaric Medicine Journal*. 39 (2012), 6; 1053-1066
3. Yue, Lili; Bian, Jing-Tan; Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Phillips, Shane A.; Makino, Ayako; Mazzone, Theodore. Apolipoprotein E Enhances Endothelial-NO Production by Modulating Caveolin 1 Interaction With Endothelial NO Synthase. // *Hypertension* (Dallas, Tex.). 60 (2012), 4; 1040-1046

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Mihalj, Martina; Drenjancevic, Ines; Vcev, Aleksandar; Sumanovac, Antun; Cavka, Ana; Vladetic, Mirjana; Gmajnic, Rudika. Basic cognitive functions across the menstrual cycle in a controlled female cohort. // *Medicinski glasnik* 2014; 11(1) (rad u postupku objavljivanja)
2. Čavka, Ana; Tadžić, Refmir; Grizelj, Ivana; Unfirer, Sanela; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. // *Medicinski vjesnik*. (2012) (rad u postupku objavljivanja).
3. Begić, Ivana; Čavka, Ana; Mihalj, Martina; Bačun, Tatjana; Drenjančević, Ines. Influence of short-term changes in sex hormones on serum concentrations of cellular adhesion molecules in young healthy women. // *Medicinski glasnik Ljekarske komore Zeničko- dobojskog kantona*. 9 (2012), 1; 32-36

Kongresno priopćenje (sažetci) u CC časopisima:

1. Cavka, Ana; Cosic, Anita; Rasic, Lidija; Grizelj, Ivana; Jelakovic, Bojan; Koller, Akos; Drenjancevic, Ines. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2 derived prostaglandins alters microvascular reactivity during high salt loading in young healthy humans // Journal of Hypertension Volume 31 e-Supplement A / Zanchetti, A (ur.). London, UK : Lippincott Williams&Wilkins, 2013. e223-e223
2. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Koller, Akos; Jelakovic, Bojan; Lombard, Julian H; Phillips, Shane A; Drenjancevic, Ines. The Effects of AT1 Receptor Blockade on Skin Microcirculatory Blood Flow and Thromboxane A2 (TXA2) Production in Young Healthy Women // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.14
3. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Goslawski, Melissa; Drenjancevic, Ines; Bian, Jing-Tan; Phillips, Shane A. Influence of Short-term High Salt Diet and Acute Exercise on Microvascular Reactivity in Humans // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.13
4. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Role of K-Channels in Microvascular Flow- Induced Dilation of Subcutaneous and Visceral Arterioles in Human Obesity // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.15
5. Robinson, Austin T; Szczurek, Mary; Bian, Jing-Tan; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Phillips, Shane A. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to impaired flow-induced dilation in visceral but not subcutaneous adipose tissue resistance arteries in human obesity // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 687.11
6. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Microvascular reactivity in subcutaneous and visceral fat tissue in human obesity // The FASEB Journal (Meeting Abstract Supplement) 2012 ; 26. Miami, FL, USA : Bethesda, MD : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2012. 853.28

7. Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H.; Mihaljević, Ivan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. Mechanisms of peripheral tissue blood flow influenced by high salt diet in young healthy female human subjects // Abstracts of the 21st European Meeting on hypertension and Cardiovascular Prevention ; u: Journal of Hypertension 29 (2011) (e-Suppl. A). 2011. e196-e196
8. Manojlović, Dragan; Čavka, Ana; Ivanović, Zrinka; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygen treatment modifies the mechanisms eliciting vasorelaxation to acetylcholine in female diabetic rats // Abstracts of FAME 2011 ; u: Acta Physiologica 202 (2011) (S684). 2011. 73-74 (lecture,international peer-review,abstract,scientific).
9. Pandurić, Ana; Plazibat, Ana; Stupin, Marko; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. The effects of energy drink on cognitive functions // European Journal of Medical Research, Abstract book, 22nd European Students Conference. I. Holzapfel Publishers, 2011. 150-150
10. Plazibat, Ana; Pandurić, Ana; Stupin, Marko; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Physiological reaction and mental stress test results after consumption of energy beverages // European Journal of Medical Research, Abstract book, 22nd European Students Conference. I. Holzapfel Publishers, 2011. 148-148
11. Stupin, Marko; Plazibat, Ana; Pandurić, Ana; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Cardiovascular and neuromuscular changes after consumption of energy beverages // European Journal of Medical Research, Abstract book, 22nd European Students Conference. I. Holzapfel Publishers, 2011. 149-149
12. Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Begić, Ivana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H; Mihaljević, Ivan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. Influence of High Salt Diet on Microvascular Reactivity in Young Healthy Female Human Subjects // Selected abstracts of the 2nd International Symposium on Hypertension November ; u: Kidney and Blood Pressure Research 33 (2010) (6) 413-441 ; 6 / Ines Drenjančević, Ines ; Jelakovic, Bojan ; Koller, Akos, editor(s).Karger, 2010. 416-416

Kongresno priopćenje (sažetci) u ostalim časopisima:

1. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Loncaric, Zdenko; Popovic, Brigita; Drenjancevic, Ines. Effects of dietary zinc and selenium on vascular responses to acetylcholine and reduced pO₂ in aortic rings of male Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCD377
2. Cavka, Ana; Manojlovic, Dragan; Lucic, Dejana; Grizelj, Ivana; Drenjancevic, Ines. Oestrogen has protective effect on acetylcholine induced relaxation of aortic rings in diabetic rats // Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 21.
3. Cosic, Anita; Cavka, Ana; Rasic, Lidija; Drenjancevic, Ines. Does oxidative stress has effect on microvascular reactivity in young healthy individuals? // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCD372
4. Cosic, Anita; Novak, Sanja; Cavka, Ana; Popovic, Brigita; Loncaric, Zdenko; Drenjancevic, Ines. Effect of variable selenium and zinc food content on the level of oxidative stress in Sprague-Dawley rats // Periodicum Biologorum, Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 21.
5. Drenjancevic, Ines; kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlovic, Dragan; Mihaljevic, Zrinka; Mihalj, Martina; Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradzikovic, Ivana. Hyperbaric oxygenation - the role of EETs // Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 26.
6. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Novak, sanja; Drenjancevic, Ines. Vascular responses of middle cerebral arteries to flow-induced dilation of ovariectomized Sprague-Dawley rats // Periodicum biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 28.
7. Ivic, Ivan; Novak, Sanja; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Loncaric, Zdenko; Koller, Akos; Drenjancevic, Ines. Altered vascular response to acetylcholine and reduced pO₂ in isolated carotid arteries in rats fed by chow containing varied zinc and selenium content // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCC398.

8. Rasic, Lidija; Cavka, Ana; Bari, Ferenc; Drenjancevic, Ines. Reproducibility of post-occlusion reactive hyperaemia assessed by laser Doppler flowmetry in young healthy women // Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines (ur.).Zagreb, 2013. 49.
9. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Drenjancevic, Ines. Vascular responses to acetylcholine- and hypoxia-induced dilation of diabetic ovariectomized rats // Biopolymers & Cell 2013. Vol. 29. N2 supplementary 1-100 / El'Skaya, Anna V (ur.). Kijev, Ukrajina, 2013. 56-56.
10. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Goslawski, Melissa; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Short-term high salt diet reduces brachial artery endothelial function in the absence of changes in blood pressure // Artery Research / Cockcroft, J.R., editor(s). Oxford, UK : Elsevier, 2012. 198-198.
- 11.. Kibel, Aleksandar; Cavka, Ana; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Cosic, Anita; Falck, JR; Drenjancevic, Ines. Modulation of aortic reactivity to angiotensin-(1- 7) with intermittent hyperbaric oxygenation in diabetic rats // Proceedings of The Physiological Society 27. London, UK, 2012. PC177.
12. Manojlovic, Dragan; Cavka, Ana; Drenjancevic, Ines. Vascular relaxation to acetylcholine in female diabetic rats that underwent hyperbaric oxygenation ; the role of EETs and 20-HETE // Proceedings of The Physiological Society 27. London, UK, 2012. PC180.
13. Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H.; Mihaljević, Ivan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. High salt diet is associated with impaired microvascular reactivity in young healthy female human subjects // Biopolymers and Cell / El'Skaya, Anna V., editor(s). Kijev, Ukrajina, 2011. 76-76 5.
14. Kibel, Aleksandar; Cavka, Ana; Drenjancevic, Ines. Effects of hyperbaric oxygen therapy on reactivity of rat aortic rings to angiotensin II and angiotensin-(1-7) // Proceedings of The Physiological Society Physiology 2011. Oxford, UK, 2011. PC229-PC229
15. Mihalj, Martina; Čavka, Ana; Drenjančević-Perić, Ines; Begić, Ivana; Vladetić, Mirjana; Šumanovac, Antun; Včev, Aleksandar; Gmajnić, Rudika. Improved performance

of attention task in mid- luteal phase of menstrual cycle can be influenced by progesterone, but not estrogen // Proceedings of The Physiological Society Physiology 2010. 2010. PC178-PC178.

Sažetci u zbornicima skupova:

1. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Loncaric, Zdenko; Popovic, Brigita; Drenjancevic, Ines. Effects of dietary zinc and selenium on vascular responses to acetylcholine and reduced pO₂ in aortic rings of male Sprague-Dawley rats // IUPS 2013 Abstract book 2013. 1068-1069 ; PCD377
2. Cosic, Anita; Cavka, Ana; Rasic, Lidija; Drenjancevic, Ines. Does oxidative stress has effect on microvascular reactivity in young healthy individuals? // IUPS 2013 Abstract book 2013. 1065-1066 ; PCD372
3. Ivic, Ivan; Novak, Sanja; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Loncaric, Zdenko; Koller, Akos; Drenjancevic, Ines. Altered vascular response to acetylcholine and reduced pO₂ in isolated carotid arteries in rats fed by chow containing varied zinc and selenium content // IUPS 2013 Abstract book 2013. 870 ; PCC398
4. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Jelakovic, Bojan; Lombard, Julian H; Mihaljevic, Ivan; Koller, Akos; Seric, Vatroslav; Drenjancevic, Ines. Role of constrictor prostaglandins in high salt diet-induced microvascular dysfunction in humans // The Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with International Participation 2012, Book of abstracts
5. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan; Sczcurek, Mary; Nguyen, Van; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Microvascular reactivity in subcutaneous and visceral adipose tissue in human obesity // The Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with International Participation 2012, Book of abstracts.
6. Ćosić, Anita; Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Oxidative stress in Sprague-Dawley healthy rats that underwent hyperbaric oxygenation // 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences of the University of Pécs (1st IDWoNS / UP), Book of Abstracts. Pečuh, Mađarska, 2012. 18-19

7. Begić, Ivana; Čavka, Ana; Mihalj, Martina; Bačun, Tatjana; Drenjančević, Ines. Utjecaj kratoročnih promjena razine spolnih hormona na serumsku koncentraciju staničnih adhezijskih molekula u mladim zdravim žena/Influence of short-term changes in sex hormones on serum concentrations of cellular adhesion molecules in young healthywomen // ISCEM 2011 International scientific conference on endocrinology and metabolism 2011. 5. hrvatski kongres s međunarodnim sudjelovanjem, knjiga sazetaka/book of abstracts. 2011. 86-87

8. Begić, Ivana; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Ivanović, Zrinka; Drenjančević-Perić, Ines. Does baroreflex have any role in the long-term control of blood pressure? // .CROSS 2010. Book of abstracts.

Pasivno sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

1. 3rd Stroke Prevention in Atrial Fibrillation (SPAF) Academy. Croatian Cardiology Society. 11.-14.04.2013. Osijek, Hrvatska.
2. Pre-Congress Cymposium: Kidneys, metabolism, environment and sympathetic tone in hypertension. Investigator generated staellite symposia ESH 2013. 10.-12.06.2013. Zagreb, Hrvatska.
3. 8th ISABS Conference on Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. International Society for Applied Biological Sciences. 24.-28.06.2013. Split, Hrvatska

Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama:

1. Hrvatsko društvo fiziologa
2. Hrvatsko društvo za hipertenziju
3. The Physiological Society (UK)

